



**HAL**  
open science

# Étude de la réponse adaptative rénale et des mécanismes sous-jacents après exposition chronique à de faibles concentrations d'uranium ou de fluor

Alice Bontemps

## ► To cite this version:

Alice Bontemps. Étude de la réponse adaptative rénale et des mécanismes sous-jacents après exposition chronique à de faibles concentrations d'uranium ou de fluor. Biologie cellulaire. Université Paris Saclay (COmUE), 2019. Français. NNT : 2019SACLS544 . tel-03505882

**HAL Id: tel-03505882**

**<https://theses.hal.science/tel-03505882>**

Submitted on 1 Jan 2022

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# Étude de la réponse adaptative rénale et des mécanismes sous-jacents après exposition chronique à de faibles concentrations d'uranium ou de fluor

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay  
Préparée à l'université Paris-Sud

École doctorale n°569  
Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué  
Discipline : Toxicologie

Thèse réalisée au Laboratoire de Radiobiologie et de radioToxicologie (IRSN),  
présentée et soutenue à l'IRSN, Fontenay-Aux-Roses,  
le 9 Décembre 2019, par

**Alice BONTEMPS**

## Composition du jury :

Pr. Armelle BAEZA (Univ. Paris Diderot, Paris)	Présidente du jury
Dr. Nathalie BONVALLOT (EHESP, Rennes)	Rapporteur
Pr. Nicolas PALLET (HEGP, Paris)	Rapporteur
Dr. Georges CARLE (CNRS-CEA, Nice)	Examineur
Dr Delphine ROUSSEAU (INRA, Jouy-en-Josas)	Examineur
Pr. Olivier BARBIER (Cinvestav, IPN, Mexique)	Co-directeur de thèse
Dr. Yann GUEGUEN (IRSN, Fontenay-aux-Roses)	Directeur de thèse

NNT : 2019SACLS544



## REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier le Docteur Nathalie Bonvallot et le Professeur Nicolas Pallet qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse en tant que rapporteurs.

Je remercie le Professeur Armelle Baeza, les Docteurs Delphine Rousseau et Georges Carle d'avoir accepté d'être membres de mon jury en tant qu'examineurs.

Je tiens également à adresser mes remerciements au Docteur Karine Tack pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire de radiobiologie et de radiotoxicologie. Je remercie également le Dr Laurence Roy qui, durant cette période de transition au sein du laboratoire, a su me conseiller avec beaucoup de bienveillance.

Je remercie le Professeur Olivier Barbier pour ses conseils tout au long de cette thèse. Je lui adresse un grand merci pour cet accueil si chaleureux au sein du CINVESTAV lors de mon séjour au Mexique, et pour cette bonne humeur constante dont il fait preuve.

Enfin, je tiens à adresser un très grand merci au Docteur Yann Guéguen pour sa disponibilité et ses conseils. J'ai énormément appris durant ces trois années de thèse, et je suis consciente que cela est dû à la confiance qu'il a su m'accorder tout au long de ce projet. Merci également pour toutes ses précieuses corrections qui m'ont permis d'atteindre la dernière ligne droite de cette grande aventure !

Bien évidemment, je tiens également à adresser mes plus grands remerciements aux personnes qui m'ont apporté leur aide technique au sein du laboratoire, notamment Victor Magneron, Christelle Elie, Céline Gloaguen et Dimitri Kerzelidze. De plus, je tiens à souligner la chance que j'ai eu de pouvoir encadrer et travailler aux côtés de Laurine Conquet lors de son stage à l'IRSN. Tu es bosseuse, énergique, gentille (et pleine de caractère! ^^) et je sais que toute personne travaillant à tes côtés sera très chanceuse, tout comme je l'ai été. J'ai eu énormément de chance de t'avoir à mes côtés durant ce projet, merci beaucoup !

Parmi toutes les personnes qui m'ont aidé durant ces trois années, je remercie le Docteur Mohamedamine Benadjaoud pour son expertise en biostatistiques qui m'a permis de voir des étoiles là où je ne le pensais pas possible. Merci également à toute l'équipe du GSEA qui en ont vu de toutes les couleurs avec mes souris, et aux Docteurs Christelle Demarquay et Vincent Paget pour m'avoir appris à utiliser le FACS et pour m'avoir conseillée sur toutes les mises au point effectuées.

Merci au Docteur Tény Ebrahimian pour son aide précieuse, notamment grâce à son expertise sur l'inflammation, mais aussi pour tous ses très bons conseils et ces excellents moments passés ensemble à discuter. Ta grande gentillesse et ton calme sont un vent d'air frais dans ce marathon qu'est la thèse.



Un grand merci à tous les membres du laboratoire qui m'ont si bien accueillie et qui ont toujours été d'une grande bienveillance envers moi. J'ai eu beaucoup de chance de pouvoir faire ma thèse entourée de gens tels que vous. Merci pour vos conseils, nos discussions et nos rires.

J'adresse un grand merci à mes amis et à ma famille qui, même s'ils ne savaient pas toujours « ce que je faisais vraiment au juste », m'ont toujours apporté un grand soutien moral et affectif.

Enfin, je ne remercierai jamais assez le fou qui a accepté de devenir mon mari. Me voilà Mme Karcher, et c'est le plus beau des accomplissements que j'aie pu réaliser durant cette année ! Tu as été si calme et gentil avec moi : toujours aux petits soins... Si cette thèse s'est si bien déroulée c'est avant tout parce que j'avais la chance de t'avoir à mes côtés. Et je ne veux plus jamais qu'il en soit autrement !

Maman, parce que tout ce que j'accomplirai n'aurait jamais existé sans toi, cette thèse est aussi la tienne...



## SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES.....	9
LISTE DES TABLEAUX .....	13
ABRÉVIATIONS.....	15
RÉSUMÉ.....	17
ABSTRACT.....	19
AVANT-PROPOS.....	21
INTRODUCTION .....	27
I.    Le contexte des faibles doses.....	29
A.    Les réponses linéaires sans seuil et les réponses non linéaires .....	31
B.    Les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la réponse adaptative à faible dose (revue n°1) .....	33
II.   La néphrotoxicité de substances exogènes.....	37
A.    Le système rénal.....	37
1.    Anatomie .....	37
2.    Fonctions physiologiques .....	37
B.    Les néphropathies .....	39
1.    Classement des atteintes rénales cliniques.....	39
2.    Les différents types de néphropathies.....	41
3.    Les marqueurs de néphrotoxicité.....	45
III.  L'uranium.....	53
A.    Généralités .....	53
1.    Historique .....	53
2.    Propriétés physico-chimiques .....	53
3.    Propriétés radiologiques .....	55
4.    Origine et utilisations .....	55
5.    Sources d'expositions.....	57
B.    Biocinétique dans l'organisme .....	57
1.    Absorption.....	57
2.    Rétention et élimination .....	59
3.    Distribution.....	61
C.    Toxicité .....	61
1.    Toxicité chimique versus radiotoxicité.....	63
2.    Génotoxicité .....	63
3.    Néphrotoxicité.....	65
4.    Toxicité osseuse.....	67





5.	Hépatotoxicité .....	69
6.	Toxicité sur le système nerveux central .....	71
7.	Reprotoxicité .....	71
8.	Toxicité sur le système respiratoire .....	73
9.	Toxicité sur le système hémato-immunitaire.....	75
D.	La néphrotoxicité de l'uranium : des mécanismes moléculaires aux effets biologiques et épidémiologiques .....	77
IV.	Le fluor.....	81
A.	Généralités .....	81
1.	Propriétés chimiques.....	81
2.	Origine et utilisations .....	81
3.	Sources d'expositions chez l'Homme .....	83
B.	Biocinétique dans l'organisme .....	85
1.	Absorption.....	85
2.	Distribution.....	87
3.	Rétention et élimination .....	89
C.	Effets sanitaires .....	89
1.	Toxicité aiguë.....	89
2.	Toxicité chronique : la fluorose .....	91
D.	Organotoxicité .....	93
1.	Néphrotoxicité.....	93
2.	Neurotoxicité.....	99
3.	Toxicité sur la thyroïde .....	101
4.	Hépatotoxicité .....	101
5.	Reprotoxicité .....	103
6.	Cardiotoxicité .....	103
E.	Mécanismes impliqués dans la toxicité du fluor .....	105
1.	Mécanismes moléculaires et voies de signalisation impliqués dans la toxicité du fluor	105
2.	Mécanismes cellulaires impliqués dans la toxicité du fluor .....	113
	PROBLÉMATIQUE .....	127
	MATÉRIEL ET MÉTHODES .....	133
I.	Matériel des études <i>in vivo</i> .....	135
A.	Modèle animal.....	135
1.	Autorisation du projet expérimental.....	135
2.	Modèle souris C57BL/6J et hébergement à l'animalerie .....	135
B.	Préparation des solutions.....	135
1.	Solutions anesthésiques.....	135
2.	Nitrate d'uranyle .....	135



3.	Fluorure de sodium .....	137
4.	Choix de l'eau de boisson .....	137
II.	Méthodes des études <i>in vivo</i> .....	139
A.	Protocoles expérimentaux .....	139
1.	Protocole d'exposition aiguë (challenge) .....	139
2.	Protocole de contamination chronique (prime) suivi d'une exposition aiguë (challenge) .....	141
B.	Techniques d'analyses biologiques .....	141
1.	Prélèvement du matériel biologique.....	141
2.	Techniques de métrologie de l'uranium et du fluor .....	143
3.	Dosage des paramètres de biochimie clinique.....	147
4.	Techniques de quantification de l'expression génique .....	147
5.	Techniques de mesure des activités enzymatiques des caspases 3/7 .....	149
6.	Dosage ELISA .....	151
7.	Analyses histologiques .....	151
III.	Les expérimentations <i>in vitro</i> .....	157
A.	Modèle cellulaire.....	157
B.	Préparation du milieu de culture cellulaire et des traitements .....	157
C.	Analyses FACS.....	159
D.	Activités caspases 3/7 .....	161
E.	Dosages de la $\gamma$ -glutamyltransférase et de la phosphatase alcaline.....	163
F.	Immunomarquage de $\gamma$ -H <sub>2</sub> AX.....	163
IV.	Analyses statistiques .....	163
	RÉSULTATS.....	167
I.	Néphrotoxicité de l'uranium et du fluor après une injection aiguë chez la souris C57BL/6J..	169
A.	Étude expérimentale préliminaire sur le fluor .....	169
1.	Protocole .....	169
2.	Diurèse.....	169
3.	Métrologie du fluor dans les urines .....	169
4.	Métrologie du fluor dans les tissus .....	171
5.	Conclusion .....	171
B.	Test d'immunomarquage des CDB à l'ADN chez des souris C57BL/6J exposées à l'uranium ou au fluor .....	173
1.	Test d'immunomarquage de $\gamma$ -H <sub>2</sub> AX chez des souris exposées à l'uranium.....	173
2.	Test d'immunomarquage de $\gamma$ -H <sub>2</sub> AX chez des souris exposées au fluor.....	173
3.	Conclusion .....	175
C.	Comparaison de la néphrotoxicité de l'uranium et du fluor 48h et 72h après traitement aigu .....	175
1.	Contexte et protocole .....	175



2. Résultats .....	175
3. Conclusion .....	177
D. Comparaison des phénotypes et des mécanismes moléculaires induits par deux néphrotoxiques : le nitrate d'uranyle et le fluorure de sodium.....	177
II. Mise en évidence de la réponse adaptative induite au niveau rénal après une exposition chronique à de faibles concentrations d'uranium et de fluor .....	181
A. Contexte .....	181
B. La réponse adaptative rénale suite à une exposition chronique au nitrate d'uranyle et au fluorure de sodium chez la souris .....	181
1. Article .....	181
2. Résultats complémentaires.....	183
C. Conclusion .....	187
III. Résultats préliminaires obtenus <i>in vitro</i> suite à une exposition à l'uranium ou au fluor ...	189
A. Tests phénotypiques réalisés après contamination aiguë à l'uranium .....	189
B. Test d'immunomarquage de $\gamma$ -H <sub>2</sub> AX après contamination aiguë à l'uranium.....	191
C. Détection de l'apoptose après une contamination des cellules HK-2 à l'uranium ou au fluor. ....	191
DISCUSSION .....	197
CONCLUSION GÉNÉRALE .....	225
VALORISATIONS.....	231
I. Publications .....	233
Articles.....	233
Revues .....	233
II. Communications orales et affichées .....	235
ANNEXES.....	237
BIBLIOGRAPHIE.....	245



## **LISTE DES FIGURES**

Figure 1 : Exemples de sources d'expositions à la radioactivité sur l'Homme.....	28
Figure 2 : Quelques exemples de sources d'expositions aux agents chimiques xénobiotiques .....	28
Figure 3 : Représentation schématique de relations dose-réponses plausibles pour le risque de cancer associé à une exposition aux rayonnements ionisants. ....	30
Figure 4 : Schéma d'une coupe longitudinale de rein et de son unité de filtration : le néphron .....	36
Figure 5 : Les classifications des atteintes rénales selon les critères RIFLE .....	38
Figure 6 : Exemples de substances associées à des atteintes rénales : sites et mécanismes d'atteinte .....	40
Figure 7 : Exemples de biomarqueurs de néphrotoxicité exprimés dans différentes régions du néphron..	50
Figure 8 : Chaîne de désintégration de l'uranium .....	54
Figure 9 : Carte de la teneur moyenne en uranium des unités géologiques en France.....	56
Figure 10 : Localisation de l'uranium dans les TCP du rein .....	60
Figure 11 : Distribution intracellulaire de l'uranium .....	60
Figure 12 : Induction des cassures double brin à l'ADN dans le noyau de cellules rénales exposées à l'uranium .....	62
Figure 13 : Distribution de l'uranium dans les segments S3 des TCP après injection chez le rat .....	64
Figure 14 : Observation de l'autophagie induite dans des cellules ostéoblastiques après exposition à l'uranium .....	68
Figure 15: Cartographie de l'uranium dans l'épithélium neural olfactif après instillation nasale chez le rat par méthode SIMS.....	70
Figure 16 : Schéma représentant l'occurrence du fluor dans les nappes phréatiques.....	80
Figure 17 : Carte mondiale des nappes phréatiques aux niveaux de fluor supérieurs à 1.5 mg/L .....	82
Figure 18 : Dommages tubulaires rénaux induits dans le rein par une contamination chronique au fluor chez le rat .....	94
Figure 19 : Résumé de la neurotoxicité induite par le fluor.....	98
Figure 20: Lésions histopathologiques du tissu hépatique après exposition chronique au fluor .....	100
Figure 21 : Dommages structuraux induits le fluor dans le tissu cardiaque de rat.....	102
Figure 22 : Modèle d'activation de la voie NFκB et de l'induction de l'inflammation dans la cellule.....	106
Figure 23 : Cascade d'activation des protéines MAPK impliquées dans le processus d'apoptose et de survie de cellules pulmonaires exposées au fluor .....	108
Figure 24: Mécanismes d'action impliqués dans la production d'IL-8 induite par le fluor dans des cellules pulmonaires.....	108
Figure 25: Modèle d'activation des voies MAP3K, JNK et de l'autophagie dans des améloblastes murins exposés au fluor .....	108
Figure 26: Modèle des voies impliquées dans le stress du RE induit par le fluor et l'interaction entre le stress du RE et l'apoptose .....	110





Figure 27 : Modèle d'activation de la voie apoptotique mitochondriale par le fluor .....	110
Figure 28 : Dommages à l'ADN induits par le fluor dans l'organe adamantin de rongeurs exposés au fluor .....	118
Figure 29 : Dommages ultrastructuraux et formation d'autophagosomes dans le tissu hépatique de souris exposées au fluor .....	122
Figure 30 : Méthodologie pour la mise en évidence d'une réponse adaptative en comparant des animaux ayant reçu une dose prime et une dose challenge avec des animaux ayant reçu seulement une dose challenge .....	128
Figure 31 : Préparation des eaux de boissons contaminées à l'uranium et au fluor .....	134
Figure 32 : Protocole expérimental de traitement aigu (challenge) d'uranium ou de fluor par injection IP chez la souris C57BL/6J .....	138
Figure 33 : Protocole expérimental de contamination chronique (prime), suivie d'un traitement aigu (challenge) par injection IP d'uranium ou de fluor chez la souris C57BL/6J .....	140
Figure 34 : Schéma du principe de l'ICP-MS.....	142
Figure 35 : Méthode de lecture des graphes obtenus en cytométrie en flux.....	158
Figure 36: Spectres d'excitation et d'émission des différents fluorochromes utilisés en cytométrie en flux .....	160
Figure 37 : Diurèse de souris traitées avec du fluor .....	168
Figure 38 : Métrologie du fluor dans les urines de souris traitées avec du fluor.....	168
Figure 39 : Dommages à l'ADN induits par une contamination à l'uranium chez des souris C57BL/6 .....	172
Figure 40 : Dommages à l'ADN induits dans les cellules rénales de souris traitées au fluor .....	174
Figure 41 : Répartition du nombre de foyers $\gamma$ -H2AX dans le même modèle .....	174
Figure 42 : Expression génique de biomarqueurs de néphrotoxicité dans le rein de souris traitées à l'uranium ou au fluor 48 et 72 heures après injection IP .....	176
Figure 43 : Expression de gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif dans les reins de souris exposées à l'uranium (A) ou au fluor (B).....	182
Figure 44 : Activité des enzymes GGT (A) et PAL (B) dans des cellules HK-2 traitées à l'uranium.....	190
Figure 45 : Immunomarquage de $\gamma$ -H2AX dans des cellules HK-2 traitées à l'uranium .....	190
Figure 46 : Pourcentage de cellules HK-2 marquées par l'Annexine V et/ou par To-Pro 3 sans traitement (A) ou après 5 heures d'exposition à 0.1 $\mu$ M de staurosporine (B) .....	192
Figure 47 : Activité des caspases 3/7 dans des cellules HK-2 exposées chroniquement puis de manière aiguë à l'uranium.....	194
Figure 48 : Activité des caspases 3/7 dans des cellules HK-2 exposées de manière aiguë au fluor.....	194
Figure 49 : Schéma résumant les mécanismes d'action de l'apoptose, l'inflammation, l'autophagie et la réponse UPR ainsi que les résultats obtenus durant la thèse.....	226



## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Les cinq stades d'IRC en fonction de leur DFG et de leur albuminurie. ....	40
Tableau 2 : Les différentes unités de mesure de la radioactivité.....	54
Tableau 3 : Caractéristiques des principaux isotopes de l'uranium.....	54
Tableau 4 : Composition et activité des trois types d'uranium.....	54
Tableau 5 : Séquences des amorces de gènes évalués avec la méthode SYBR (a) et avec la méthode Taqman (b) .....	146
Tableau 6 : Composition de l'Hypotonic Lysis Buffer .....	148
Tableau 7 : Les différentes étapes de déshydratation des échantillons biologiques .....	150
Tableau 8 : Méthode de calcul du score global et du pourcentage des lésions rénales.....	152
Tableau 9 : Étapes des immunomarquages de KIM-1, LC3-II, IRE1- $\alpha$ , ICAM, VCAM et $\gamma$ -H2AX.....	152
Tableau 10 : Étapes de la contre-coloration à l'hémalum de Mayer .....	154
Tableau 11 : Score de l'immunomarquage de LC3-II.....	154
Tableau 12 : Score histopathologique de reins de souris 48 et 72 heures après injection IP d'uranium ou de fluor .....	174



## ABRÉVIATIONS

8-OHdG : 8-hydroxydésoxyguanosine	IRC : insuffisance rénale chronique
AIF : apoptosis-inhibitor factor	IRE1- $\alpha$ : Endoribonuclease/protein kinase IRE1-like protein
AOP : adverse outcome pathway	JNK : c-Jun N-terminal kinase
ATF6 : activating transcription factor 6	KIM-1 : kidney injury molecule 1
B2MG : $\beta$ 2-microglobuline	LC3B : Microtubule-associated <i>protein</i> 1A/1B-light chain 3B
Bax : Bcl-2 associated X protein	LOAEL : Lowest Observed Adverse Effect Level
Bcl-2 : B-cell lymphoma 2	MAPK : mitogen-activated protein kinases
BER : réparation par excision de base	MDA : malondialdéhyde
CAT : catalase	MET : microscopie électronique à transmission
CDB : cassures à l'ADN double-brin	NaF : fluorure de sodium
CDK : kinases dépendantes des cyclines	NAG : N-acétyl- $\beta$ -glucosaminidase
CHOP : CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein	NER : réparation par excision de nucléotide
CLU : clusterine	NF $\kappa$ B : nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
COX-2 : cyclooxygénase 2	NGAL : lipocaline associée à la gélatinase des polynucléaires neutrophiles
CSB : cassures à l'ADN simple-brin	NHEJ : jonction d'extrémités non homologues
CTE : chaîne de transport des électrons	NO : oxyde nitrique
CYP : cytochrome P450	NOAEL : No Observed Adverse Effect Level
Cys-C : cystatine C	Nrf2 : nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
Cyt : cytochrome	OMS : Organisation Mondiale de la Santé
DFG : débit de filtration glomérulaire	OPN : ostéopontine
eIF2 $\alpha$ : eukaryotic initiation factor 2	PAL : phosphatase alcaline
ERK : extracellular signal-regulated kinase	PE : phycoérythrine
ERO : espèces réactives de l'oxygène	PERK : protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase
FITC : isothiocyanate de fluorescéine	PIXE : émission de photons X induite par particules
GAPDH : glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	PM : poids moléculaire
GGT : gamma glutamyltransférase	PM : potentiel membranaire
GPX : glutathion peroxydase	RBP : protéine de transport du rétinol
GSK3 $\beta$ : kinase glycogène synthase 3 $\beta$	RE : réticulum endoplasmique
GST : glutathion-S-transférase	SIMS : spectrométrie de masse des ions secondaires
H <sub>2</sub> S : sulfure d'hydrogène	SOD : superoxyde dismutase
HK-2 : human kidney cell 2	TBARS : Thiobarbituric acid reactive substances
HPRT : hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	TCD : tubule contourné distal
HR : recombinaison homologue	TCP : tubule contourné proximal
HSP : heat shock protein	TLR : récepteur Toll-like
ICAM-1 : intercellular adhesion protein 1	UA : uranium appauvri
ICP-MS : spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif	UE : uranium enrichi
IdP : iodure de propidium	UN : uranium naturel
IL : interleukine	UPR : unfolded protein response
iNOS : nitric oxide synthase	VCAM-1 : vascular cell adhesion protein 1
IR : insuffisance rénale	
IRA : insuffisance rénale aiguë	



## RÉSUMÉ

L'uranium (U) et le fluor (F) sont des substances néphrotoxiques naturelles et anthropogéniques auxquelles la population peut être exposée quotidiennement. Cependant, leurs effets à faibles doses restent méconnus et des études précédentes suggèrent qu'une exposition chronique à de faibles doses pourrait induire une réponse adaptative (RA). Afin de mettre en évidence cette RA rénale *in vivo*, un protocole d'exposition prime à faibles doses suivie d'un traitement challenge néphrotoxique a été mis en place. Une première étude dose-réponse aiguë a permis de définir nos conditions challenge, avec des doses néphrotoxiques de 5 et 7.5 mg/kg d'U et de F, et un temps d'analyse de 72h post-injection. Pour l'étude de la RA, les souris ont été contaminées 6 mois via l'eau de boisson à des doses prime d'U (0, 10, 20 et 40 mg/L) ou de F (0, 15, 30 et 50 mg/L), puis traitées aux concentrations « challenge ». Une RA est observée aux doses respectives de 20 et 50 mg/L d'U et de F, avec un retour à la normale de l'expression et de la sécrétion de biomarqueurs de néphrotoxicité KIM-1 et CLU en comparaison aux animaux non pré-exposés. Une diminution de l'apoptose ou de l'expression *in situ* de VCAM est observée chez les animaux pré-exposés respectivement à 20 mg/L d'U ou à 50 mg/L de fluor, concentrations auxquelles la RA a été identifiée. L'autophagie, la réponse UPR et le recrutement de cellules inflammatoires sont des mécanismes induits par l'U alors que seule la réponse UPR est induite par le F. Cependant, nos résultats ne permettent pas de les identifier comme des mécanismes impliqués dans la RA, car ces derniers sont induits avec ou sans préexposition. En conclusion, cette étude montre l'existence d'une RA dans le cadre d'une exposition chronique à de faibles doses d'U ou de F chez la souris, avec l'induction de mécanismes adaptatifs tels que la régulation de l'apoptose et de l'inflammation. Ces résultats permettent de mieux appréhender les effets de faibles expositions chroniques chez l'Homme, et d'apporter de nouvelles connaissances pour la radioprotection de l'Homme.

**Mots-clés :** uranium, fluor, réponse adaptative, faible dose, rein





## ABSTRACT

Human population can be daily exposed to uranium (U) and fluoride (F) because of their natural and anthropogenic presence in the environment. Although U and F are known to be nephrotoxicant at high doses, their effects after low dose exposures are still unknown and previous studies suggested that chronic exposures to low doses of U or F could induce adaptive responses (AR). Therefore, a mouse *in vivo* study was designed and carried out to examine whether exposure to chronic low priming doses of U and F can induce AR in the kidney upon exposure to nephrotoxic challenge treatment. A pilot dose-response study allowed selecting the nephrotoxic challenge treatments (5 mg/kg U and 7.5 mg/kg F), with a time of analysis of 72h post treatment. To study the AR, mice were exposed through drinking water for 6 months to priming doses of U (10, 20 and 40 mg/L) or F (15, 30 and 50 mg/L), and subsequently challenged. An AR was observed at the doses of 20 mg/L U and 50 mg/L F, with a return to normal gene expression and urinary levels of nephrotoxicity biomarkers KIM-1 and CLU in comparison with the non-pre-exposed mice. Apoptosis was reduced in animals pre-exposed to 20 mg/L U and a decrease of VCAM *in situ* expression was observed in animals pre-exposed to 50 mg/L F. These concentrations correspond to the appearance of AR. The unfolded protein response (UPR), autophagy and inflammatory cell recruitment were the mechanisms induced by U whereas only UPR was induced by F. However, these mechanisms were induced in challenged animals irrespective of pre-exposure. Thus, our results do not allow us to identify these mechanisms as those involved in the AR. In summary, our data showed the existence of an AR to low doses of U and F delivered chronically to mice, with the induction of adaptive mechanisms such as apoptosis and inflammatory regulation. Results of this study allow for better understanding of the potential effects chronic low-dose exposures of U and F on human population, and provide new knowledge for informing the radioprotection system.

**Keywords:** uranium, fluoride, adaptive response, low dose, kidney



---

**AVANT-PROPOS**

---



De nos jours, l'opinion publique ainsi que la recherche place la pollution de l'environnement au cœur de leurs préoccupations. Les polluants environnementaux peuvent avoir une origine naturelle ou anthropogénique et l'Homme peut y être exposé, notamment par ingestion ou l'utilisation de produits sanitaires. La recherche scientifique entreprend de nombreuses études afin de combler le manque de données et d'apporter des connaissances permettant d'estimer les risques d'expositions pour les travailleurs ainsi que pour la population générale. L'Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire confère une partie de sa recherche et de son expertise aux effets sanitaires potentiels des radionucléides sur l'Homme. Parmi ces radionucléides, l'uranium est l'un des plus importants en radiotoxicologie car il possède à la fois une toxicité chimique et radiologique, qui touche aussi bien la population générale que plusieurs catégories de travailleurs. Les travailleurs tels que les mineurs réalisant l'extraction des roches uranifères peuvent être exposés par inhalation ou par blessure transcutanée, tandis que la population générale est principalement exposée à l'uranium naturel par voie digestive, à travers l'alimentation et l'eau de boisson. L'exposition pour ces populations est majoritairement une exposition chronique ou répétée à de faibles doses.

En radiobiologie et en toxicologie, il existe plusieurs hypothèses mettant en relation le risque de décès (notamment par cancer) due aux rayonnements ionisants ou des agents chimiques en fonction de la dose reçue. Pour estimer les effets qu'ils peuvent avoir sur l'organisme, le modèle de référence est un modèle de réponse linéaire sans seuil, dans lequel une extrapolation est faite à partir des effets observés à fortes doses. Cependant, de nombreuses études expérimentales montrent que l'hypothèse linéaire sans seuil ne permet pas d'expliquer l'ensemble des effets biologiques observés après une exposition à des agents chimiques ou radiologiques. Parmi les réponses non linéaires il existe la réponse adaptative définie par une courbe en U, où il est observé une diminution du risque d'effets délétères en comparaison à ce qu'il serait attendu en réponse linéaire. De nombreuses études ont montré qu'en dessous d'une dose seuil les rayonnements ionisants ou certains agents chimiques pouvaient induire une réponse de type adaptatif. Cette réponse est caractérisée par la capacité d'un organisme pré-exposé à un faible stress, de présenter moins d'effets délétères en réponse à un second stress plus sévère. Ce serait notamment le cas de l'uranium.

Ce radionucléide est connu pour être néphrotoxique lors d'une exposition aiguë, mais l'absence d'effets délétères sur le rein après une contamination chronique a soulevé des questionnements sur le type de réponse observée dans la gamme des faibles doses. Le programme ENVIRHOM (de l'ENVIRONnement à HOMme) a été mis en place par l'IRSN depuis 2001 afin de décrire et de comprendre les conséquences sur la santé d'une exposition chronique par contamination interne par un ou plusieurs radionucléides, par irradiation externe ou par une combinaison de ces deux types d'exposition, en association ou non avec une contamination interne par d'autres contaminants environnementaux. Dans ce contexte, il est important d'étudier la toxico-dynamique (définition des cibles moléculaires, cellulaires ou tissulaires conduisant à des pathologies ou des processus d'adaptation) des types d'expositions chroniques étudiées. Ces processus de mécanismes physiopathologiques peuvent être modélisés sous forme d'AOP (Adverse Outcome Pathway) permettant de relier des événements moléculaires initiateurs aux atteintes de l'organisme telle qu'une néphrotoxicité. Le laboratoire de radiobiologie et de radiotoxicologie (LRTOX) oriente ses recherches plus spécifiquement sur les effets biologiques et sanitaires chez l'Homme suite à des expositions à faibles doses, utilisant des rongeurs (rats et souris) comme modèles d'expérimentations. Dans la continuité de ce programme, nous avons cherché à identifier la réponse



adaptative induite par une contamination chronique à de faibles doses d'uranium dans l'eau de boisson chez la souris C57/BL6, afin d'en comprendre les mécanismes biologiques.

Pour ce faire, l'uranium est comparé à un autre agent néphrotoxique d'origine naturelle et anthropogénique : le fluor. Une étude menée au CINVESTAV (Mexique) a montré qu'une pré-exposition chronique à de faibles doses de fluor réduisait les effets néphrotoxiques induits par un second traitement à la gentamicine, mettant ainsi en évidence une réponse adaptative. Ce projet de thèse est ainsi réalisé en collaboration entre le CINVESTAV et l'IRSN.





---

**INTRODUCTION**

---

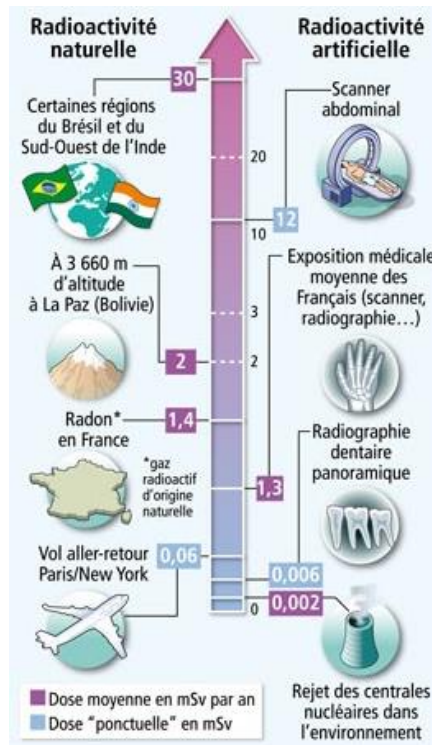


Figure 1 : Exemples de sources d'expositions à la radioactivité sur l'Homme  
 Source : Art Presse/IRSN

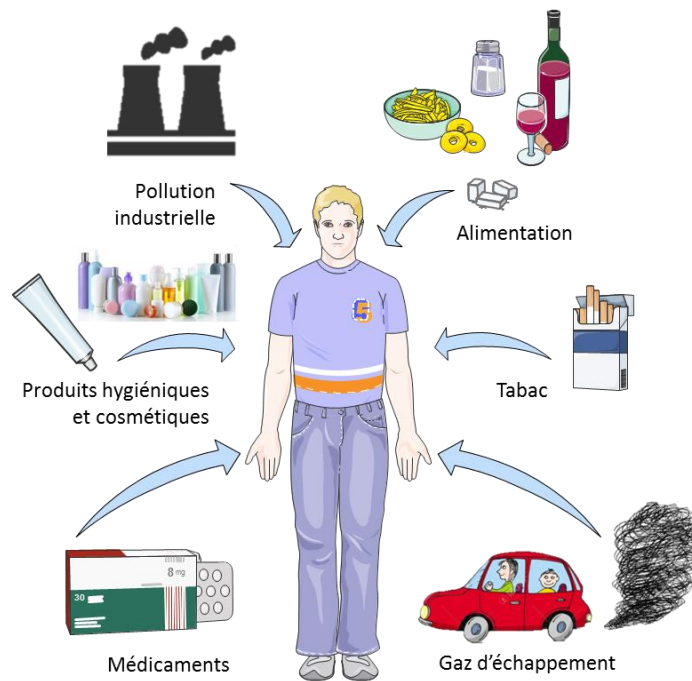


Figure 2 : Quelques exemples de sources d'expositions aux agents chimiques xénobiotiques

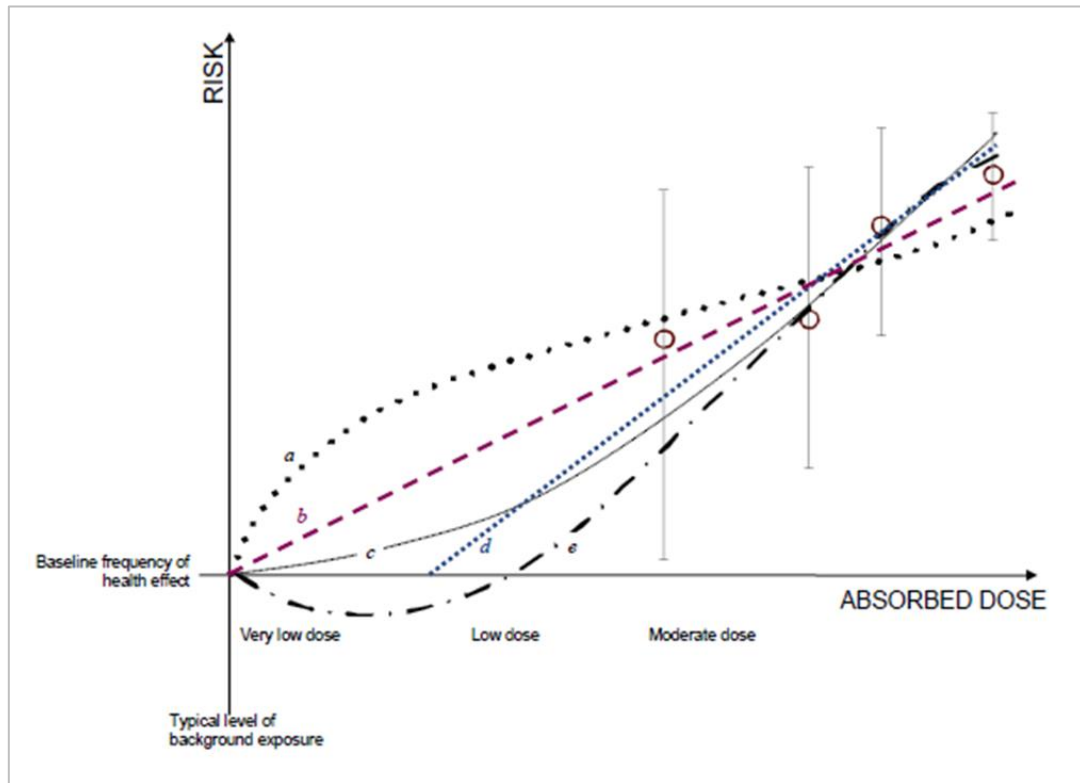
### I. Le contexte des faibles doses

L'Homme est constamment soumis à des expositions de faibles niveaux aux xénobiotiques ainsi qu'aux rayons ionisants d'origines naturelles ou anthropogéniques *via* son environnement. La population française est exposée à une irradiation naturelle estimée à environ 2.4 mSv/an en moyenne. Le radon contenu dans l'air, les rayons cosmiques frappant la Terre, et les émissions internes d'isotopes radioactifs présents dans la nourriture et l'eau de boisson contribuent majoritairement à cette exposition aux rayonnements ionisants. La population peut également être exposée à des sources de radiations anthropogéniques, notamment des rayonnements reçus lors d'examens médicaux, dont les examens radiologiques et les scanners. De plus, certains secteurs professionnels induisent une exposition aux rayonnements chez les travailleurs tels que les mineurs d'uranium, les médecins radiologues ou encore les personnels navigants des compagnies aériennes davantage exposés aux rayonnements cosmiques. Quelques exemples de sources d'exposition de radioactivité sur l'Homme sont donnés en **figure 1**. L'Homme est également exposé à de nombreux agents chimiques xénobiotiques qui peuvent perturber le bon fonctionnement de l'organisme (**figure 2**). La population générale peut être exposée à travers l'eau de boisson, la nourriture, l'air ou la peau. Les métaux lourds tels que le plomb, le mercure, le fer ou l'uranium sont présents dans notre environnement et sont souvent utilisés dans l'industrie où ils sont émis sous forme de particules fines. Ils se disséminent alors dans les eaux et les sols, contaminant la flore et la faune et se retrouvant notamment dans notre chaîne alimentaire. Les produits phytosanitaires fluorés présentent un autre exemple de xénobiotiques auxquels l'Homme est exposé de manière chronique, notamment à travers leur utilisation dans le domaine alimentaire.

La définition d'une faible dose est l'objet de nombreux débats sociétaux, politiques ou scientifiques car elle fait souvent référence à une dose à laquelle nous ne décelons que de faibles effets biologiques. L'enjeu est donc de déterminer lors d'études épidémiologiques ou toxicologiques si ces effets sont pathologiques, ou non. Les études à faibles doses ont pour but d'appréhender les effets sur l'organisme d'une exposition environnementale, représentative des concentrations auxquelles la population générale est exposée.

En toxicologie, la notion de faible dose, spécifique d'une substance chimique à l'autre, peut se baser sur la frontière définie par les « LOAEL » et « NOAEL » (Lowest Observed Adverse Effect Level, et No Observed Adverse Effect Level), qui sont respectivement la dose minimale à laquelle un effet nocif est observé et la dose sans effet nocif observé (Hubert 2010). Cependant, ces indicateurs ne sont pas toujours pertinents et le terme de faible dose se définit plus communément en prenant en compte les doses d'expositions humaines en santé publique.

Pour les rayonnements ionisants, la dose seuil des faibles doses a été définie sur la base des études épidémiologiques menées sur des survivants des bombardements d'Hiroshima et de Nagasaki (UNSCEAR 2008). Ces études ont en effet démontré que le risque de cancers augmentait de manière significative chez les personnes ayant reçu une dose supérieure à 100 mGy, tandis qu'aucune relation entre la dose de rayonnements et les risques pathologiques n'a été établie avec certitude sous cette dose seuil de 100 mGy. C'est ainsi que l'UNSCEAR, le Comité scientifique des Nations unies pour l'étude des effets des rayonnements ionisants, définit une faible dose comme une dose inférieure à 100 mGy, tandis que les doses modérées sont comprises entre 0.1 à 1 Gy, et les fortes doses supérieure à 1 Gy (UNSCEAR 2012). Bien que les études épidémiologiques n'aient pas pu démontrer



**Figure 3 : Représentation schématique de relations dose-réponses plausibles pour le risque de cancer associé à une exposition aux rayonnements ionisants.**

(a) supralinéaire; (b) linéaire sans-seuil (LNT); (c) linéaire-quadratique; (d) linéaire à seuil et (e) hormétique (réponse adaptative). Source : UNSCEAR 2012

d'effets pathologiques significatifs sous cette dose seuil de 100 mGy, cela n'exclut pas de potentiels effets délétères, qui pourraient passer inaperçu du fait des nombreux facteurs confondants ou du manque de puissance statistique.

Réussir à étudier les effets toxicologiques aux faibles doses d'agents ionisants ou d'agents chimiques est alors un challenge pour les chercheurs, car déceler des effets fins demande des effectifs suffisamment importants, des marqueurs physiopathologiques très sensibles et spécifiques ou une stratégie expérimentale dédiée à l'aide de modèles animaux génétiquement modifiés ou de plans expérimentaux particuliers.

### A. Les réponses linéaires sans seuil et les réponses non linéaires

En radiobiologie et en toxicologie, plusieurs hypothèses mettent en relation les effets des rayonnements ionisants ou des agents chimiques en fonction de la dose reçue. Pour estimer les effets qu'ils peuvent avoir sur l'organisme, le modèle de référence est un modèle de réponse linéaire sans seuil, dans lequel une extrapolation est faite à partir des effets observés à fortes doses. Le système de radioprotection actuel repose sur l'utilisation de ce modèle, cependant, d'autres formes de relations dose-réponse que la relation linéaire sans seuil pourraient exister en-dessous de 100 mGy, et celles-ci pourraient différer en fonction des pathologies et des populations (IRSN 2017).

En effet, de nombreuses études démontrent que l'hypothèse linéaire sans seuil ne permet pas d'expliquer l'ensemble des effets biologiques observés expérimentalement après exposition à des agents chimiques ou radiologiques (Tubiana et al. 2009). Parmi les réponses non linéaires présentées en **figure 3**, il existe deux courbes opposées : la réponse adaptative définie par une courbe en U, et l'hypersensibilité définie par une courbe en cloche. Lors de la réponse adaptative, une diminution du risque de cancer serait observée en comparaison à ce qu'il serait attendu en réponse linéaire, tandis qu'une augmentation du risque serait observée dans le cas d'une hypersensibilité (Feinendegen et al. 2011).

De nombreuses études ont montré qu'en dessous d'une dose seuil les rayonnements ionisants ou certains agents chimiques pouvaient induire une réponse de type adaptatif (Calabrese and Baldwin 2001, 2003; Gueguen et al. 2019; Matsumoto et al. 2007). Cette dernière est caractérisée par la capacité d'un organisme, pré-exposé à un faible stress, de présenter moins d'effets délétères en réponse à un second stress plus sévère. Cette réponse implique l'activation de mécanismes adaptatifs, mis notamment en place au niveau cellulaire, tels que le système antioxydant, les réparations à l'ADN, l'inflammation, ou encore l'apoptose. Par exemple, une première exposition à de faibles concentrations de [<sup>3</sup>H]thymidine diminue le nombre d'aberrations chromosomiques induites par une seconde exposition aux rayons-X chez des cellules lymphocytaires humaines (Olivieri et al. 1984).

Afin de mettre en évidence la réponse adaptative, des protocoles spécifiques d'exposition chronique à de faibles doses prime suivie d'une exposition challenge plus forte ont été développés, tel que dans l'étude d'Olivieri *et al.*, permettant de révéler les effets de faible amplitude observés uniquement lors de l'exposition prime à faible dose. Plus récemment, certaines de ces études ont exploré les mécanismes sous-jacents, présentés dans le chapitre suivant.



### **B. Les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la réponse adaptative à faible dose (revue n°1)**

Cette revue a été rédigée afin d'identifier les différentes études dont les données expérimentales ont mis en évidence une réponse adaptative suite à des expositions à de faibles doses de rayonnements ou de produits chimiques xénobiotiques. Cette publication identifie les voies de signalisation qui peuvent être activées lors de la réponse adaptative et met en évidence leurs interactions. Les principales voies moléculaires impliquées dans la réponse adaptative sont alors : la voie de réparation à l'ADN, la voie antioxydante Nrf2, la voie inflammatoire NFκB, ainsi que la voie des MAPK impliquées dans le cycle cellulaire et la survie cellulaire. Cette revue synthétise également les différents mécanismes adaptatifs induits au niveau cellulaire (l'autophagie, le cycle cellulaire et l'apoptose, la réponse UPR et les effets bystander) et tissulaire (le système antioxydant et la réponse immunitaire/inflammatoire) lors d'une exposition à certains agents chimiques ou aux rayonnements ionisants.





**ARTICLE 1**

**ADAPTIVE RESPONSES TO LOW DOSES OF RADIATION OR CHEMICALS:**

**THEIR CELLULAR AND MOLECULAR MECHANISMS**

Yann Guéguen, Alice Bontemps, Teni G. Ebrahimian

Cellular and Molecular Life Sciences (2019) 76(7): 1255-1273





# Adaptive responses to low doses of radiation or chemicals: their cellular and molecular mechanisms

Yann Guéguen<sup>1,2</sup> · Alice Bontemps<sup>1</sup> · Teni G. Ebrahimián<sup>1</sup>

Received: 25 July 2018 / Revised: 9 November 2018 / Accepted: 3 December 2018 / Published online: 8 December 2018  
© Springer Nature Switzerland AG 2018

## Abstract

This article reviews the current knowledge on the mechanisms of adaptive response to low doses of ionizing radiation or chemical exposure. A better knowledge of these mechanisms is needed to improve our understanding of health risks at low levels of environmental or occupational exposure and their involvement in cancer or non-cancer diseases. This response is orchestrated through a multifaceted cellular program involving the concerted action of diverse stress response pathways. These evolutionary highly conserved defense mechanisms determine the cellular response to chemical and physical aggression. They include DNA damage repair (p53, ATM, PARP pathways), antioxidant response (Nrf2 pathway), immune/inflammatory response (NF- $\kappa$ B pathway), cell survival/death pathway (apoptosis), endoplasmic response to stress (UPR response), and other cytoprotective processes including autophagy, cell cycle regulation, and the unfolded protein response. The coordinated action of these processes induced by low-dose radiation or chemicals produces biological effects that are currently estimated with the linear non-threshold model. These effects are controversial. They are difficult to detect because of their low magnitude, the scarcity of events in humans, and the difficulty of corroborating associations over the long term. Improving our understanding of these biological consequences should help humans and their environment by enabling better risk estimates, the revision of radiation protection standards, and possible therapeutic advances.

**Keywords** Adaptive response · Low-dose · Signaling pathway · Stress response · Epigenetic regulation · Defense mechanism

## Abbreviations

AhR	Aryl hydrocarbon receptor	miRNA	Micro RNA
Akt	Protein kinase B	NF- $\kappa$ B	Nuclear factor-kappa B
ARE	Antioxidant responsive element	Nfr2	NF-E2-related 2 (transcription factor)
ATM	Ataxia telangiectasia mutated	NMDR	Non-monotonic dose-response
CDK	Cyclin-dependent kinases	PERK	Protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase
DSB	Double-strand break	ROS	Reactive oxygen species
DNA-PK	DNA-dependent protein kinase	TGF- $\beta$	Transforming growth factor beta
ER	Endoplasmic reticulum	UPR	Unfolded protein response
ERK	Extracellular signal-regulating kinase	XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis
IR	Ionizing radiation	XRE	Xenobiotic responsive element
JNK	c-Jun N-terminal kinases		
MAPK	Mitogen-activated protein kinase		

✉ Yann Guéguen  
yann.gueguen@irsn.fr

<sup>1</sup> Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), PSE-SANTE, SESANE, LRTOX, B.P. no 17, 92262 Fontenay-aux-Roses Cedex, France

<sup>2</sup> Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), PSE-SANTE, SESANE, LRSI, Fontenay-aux-Roses, France

## Introduction

Too little is known about the effects of low levels of exposure to chemicals or radiation, despite the importance of this issue. Because of the varied and polymorphous nature of the various related factors and the consequent difficulty in extrapolating a signal from the diverse background noise, epidemiology alone cannot provide a clear answer.

In recent decades, however, the evidence underlying a bundle of presumption appears to show that organisms and cells can adapt to low-dose exposure. Despite discrepancies in some epidemiological and experimental studies, the complementarity of these two approaches should enable advances in answering these questions [1–3].

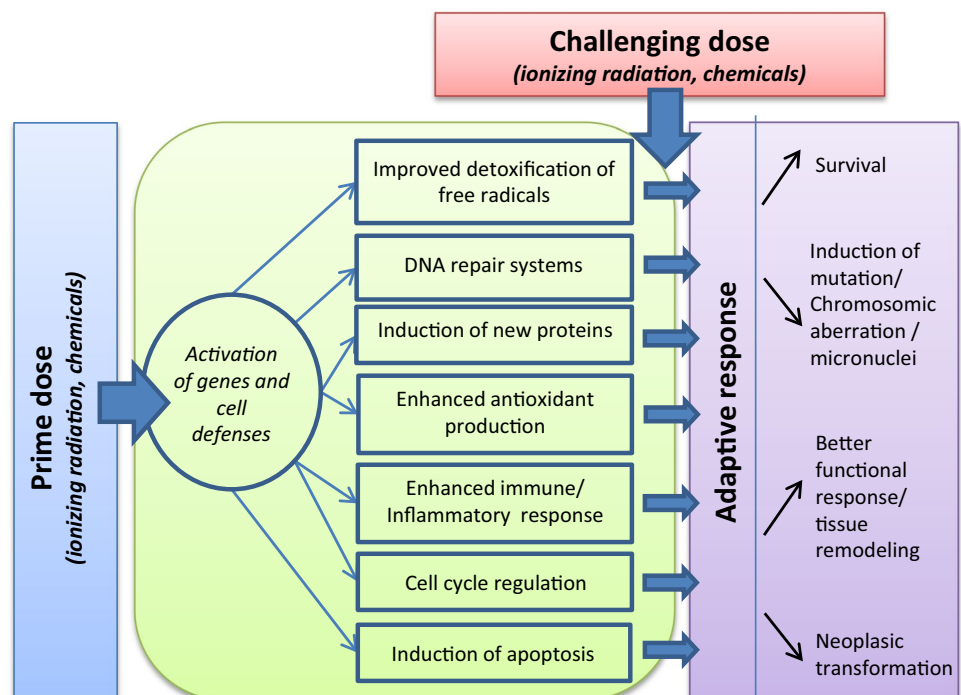
Various physical and chemical toxic agents, some of them natural (ionizing radiation), others released in the environment by human activity (environmental pollutants), affect organisms, which must adapt continuously to these external fluctuations. Human beings are continuously exposed to natural radiation to low doses (average 2.4 mSv) from radon, cosmic rays, terrestrial sources and internal emissions of radioactive isotopes in food and water. People are also exposed to anthropogenic sources of radiation used in medicine, research, and industry which contribute to about 20% of the total radiation exposure. Individual's exposure could then vary due to medical purposes, occupational exposures and living areas [4]. Cell response to these stresses determines whether the organism can function properly and survive. This response is orchestrated through a multifaceted cellular program involving the concerted action of diverse stress response pathways [5] (Fig. 1). Many studies demonstrate “non-targeted” effects, including adaptive responses, bystander effects, genomic instability, and coordinated response—a suite of effects that could modulate the relation at low doses between cancer induction and increasing doses of both ionizing radiation (IR) and chemicals. This progress in knowledge about the mechanisms of low-dose biological

effects calls for the updating of our understanding of them, particularly the adaptive response.

Two competing hypotheses propose explanations of the effects of exposure to IR or chemicals: the linear no-threshold hypothesis, similar to the basic principle of toxicology first propounded by Paracelsus that “the dose make the poison”, and its no-linear relation alternative offered by threshold models [6, 7], which assume that no increase in risk occurs at doses below a certain level. Another variant of this model is the non-monotonic dose-response model (NMDR) [8], according to which low-level exposures to chemicals or radiation might be beneficial for health, even though larger doses are harmful. The NMDR model is valid for some chemical substances and trace elements that the body needs in small amounts to stay healthy, but which may become deleterious when received in larger doses.

Current conventional models of radiation or chemical dose-response relations are inconsistent with these relatively new findings. As long as the mechanisms of the effects remain unclear, modeling low-dose effects is difficult, and its uncertainties are high. Many experimental studies of species ranging from bacteria to human beings subjected to mild stress induced by low doses of IR or other physical or chemical agents describe NMDR [8–11] that could be considered beneficial [12, 13] or detrimental [14–16]. The low-dose range for chemicals varies substantially according to the substance involved, but for IR UNSCEAR defines low doses as those below 100 mGy, moderate doses as from 0.1 to 1 Gy and high doses as those above 1 Gy [3]. In this review, we focus on the adaptive mechanisms involved after

**Fig. 1** Cellular processes of stress response pathways (adapted from [185])



low-dose chemical and radiological exposure at the level of the cell and the organism.

Numerous studies have shown that specific biological mechanisms respond adaptively to low doses of IR or chemicals. Adaptive response can be demonstrated by the ability of a biological system exposed to a small “priming” stress to exhibit a lower detrimental effect on subsequent reception of another higher radiation dose, the “challenge” dose (Fig. 1). Thus several reports and publications define a radioadaptive response as “the ability of low dose radiation to induce cellular changes that alter the level of subsequent radiation induced or spontaneous damage” [9, 17–21]. Low doses of IR, such as low doses of chemical agents, might induce biological mechanisms that make the cells better able to cope with subsequent exposures to high doses. The first adaptive response model of low-dose radiation involved a dose range of 1–100 mGy of  $\gamma$ -rays and postulated that it could be beneficial. Oliveri et al. [9] reported fewer chromatid aberrations for cells previously exposed to a low concentration of [ $^3$ H]thymidine before acute X-rays than when exposure began only with acute X-rays. The multiple descriptions of low doses stimulating the body’s natural defenses in a wide variety of organisms suggest that this phenomenon is evolutionarily conserved [22]. Nevertheless, adaptation does not occur in every system and with all exposure situations.

Adaptive responses to low doses have been convincingly demonstrated in cultured cells, although doubt remains over how they influence risk in multicellular organisms. Mechanistic studies are thus important for reducing uncertainty in the estimation of both cancer and non-cancer diseases. We will describe several underlying mechanisms at the level of molecules, cells, tissues, and organisms. At the molecular level, key signaling pathways have been identified, by their direct induction by IR or chemicals; these include DNA damage response, as well as reactive oxygen species (ROS) and other signaling molecules involved in cell survival. Adaptive processes also occur at the cellular level due to molecular events: via the elimination of damaged organelles (autophagy) or of damaged cells (through apoptosis or necrosis), or by cell cycle delay or the unfolded protein response. Finally, tissue or organism processes can be implicated in this response by inducing cell proliferation or differentiation, controlling immune/inflammatory reactions, inducing toxic substance excretion through transporters, or activating distant cells through bystander/abscopal effects.

The originality of this review lies in its focus on studies showing an adaptive response to low doses of both IR and chemicals and its updating of the mechanisms thus far identified in other recent reviews [16, 20, 23]. Better knowledge of these mechanisms is needed to improve our understanding of health risks at low levels of environmental or occupational exposure and their involvement in cancer or non-cancer diseases.

## Molecular mechanisms of intracellular signaling pathways

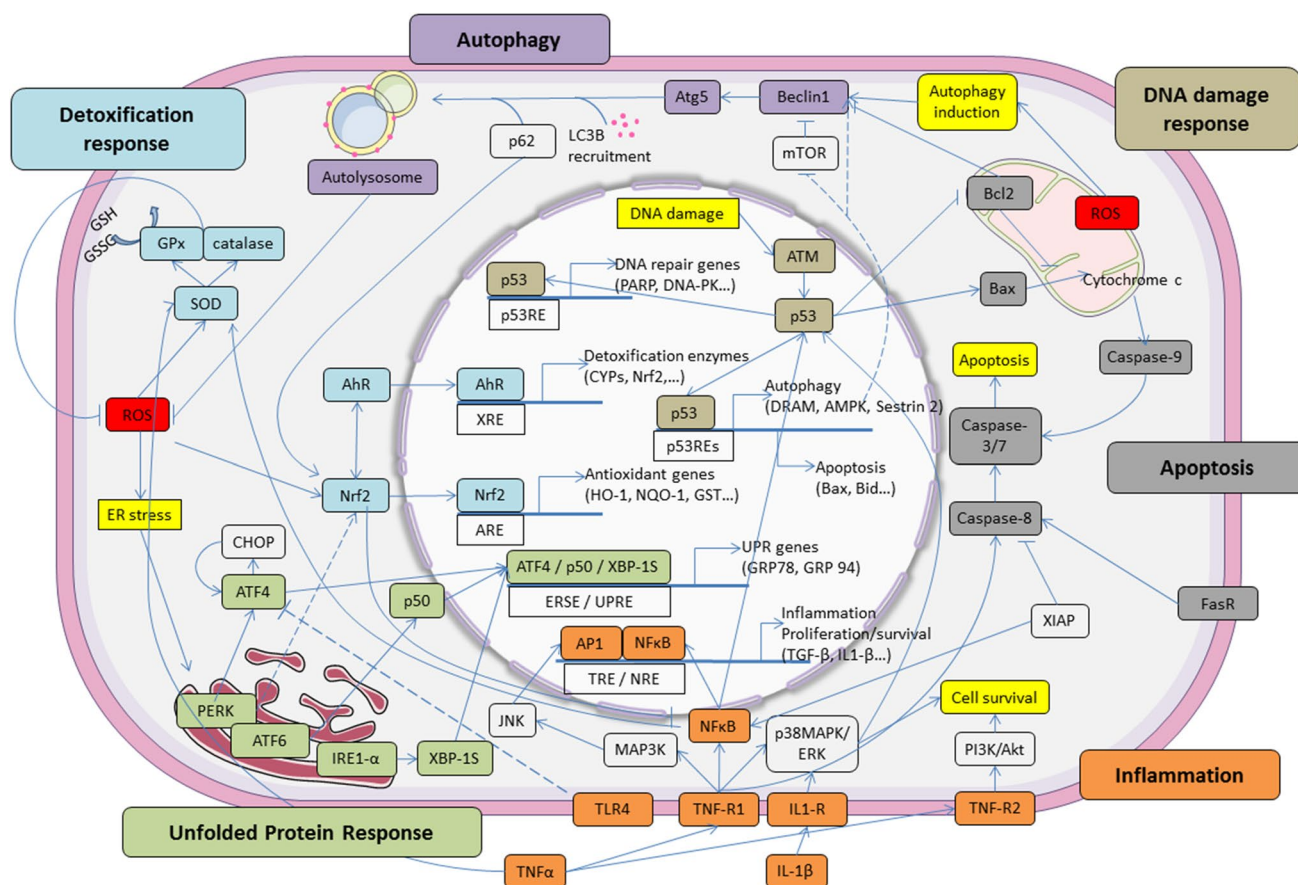
These pathways have evolved to overcome cellular perturbation and promote survival of the organism. Figure 2 and Table 1 summarizes the main data about the different signaling pathways involved in the adaptive response to low doses of radiation and chemicals reported in this review. They include the DNA repair pathway, antioxidant response pathway, immune/inflammatory response, cell survival/death pathway, endoplasmic response to stress, and numerous proteins and transcription factors involved in these stress response pathways [16, 24, 25].

The enhanced expression of stress proteins is considered to be an important adaptive response to adverse conditions such as exposure to chemicals, heavy metals, or IR. They belong to a wide range of defense mechanisms described in this section but also to the cellular and tissue responses detailed further on.

## DNA damage response

To protect the genome integrity, cells possess a sophisticated mechanism of DNA lesions detection and repair, the DNA damage response [26]. Endogenous or exogenous stress can induce several different DNA repair systems, including the mismatch repair, base excision repair, nucleotide excision repair, homologous repair, and non-homologous end joining repair systems.

Many studies have showed that radiation or chemical-induced adaptive responses involve cell cycle regulation and DNA-dependant protein kinases [27, 28] (Table 1). Mammalian cells can incur DNA damage from endogenous factors such as oxidative metabolism and from exogenous factors such as exposure to IR or to genotoxic chemicals. The induction of an adaptive response through DNA repair pathway was first shown with alkylating agents. Cells chronically exposed to low non-toxic doses were resistant to the induction of sister chromatid exchange by subsequent exposures to high doses of the same chemical [29]. Olivieri et al. [9] further reported the first description of a radioadaptive response in human lymphocytes: a lower frequency of chromosomal aberrations after a high (challenge) dose in cells previously treated with very low (adaptive) doses of IR. A similar induced adaptive response in human lymphocytes was observed in individuals occupationally exposed to x- or  $\gamma$ -rays, who had lower dicentric frequencies than did non-occupationally exposed individuals [30]. Other authors have shown that the induction of DNA damage repair pathways is an important component of the radioadaptive response



**Fig. 2** Crosstalk of signaling pathways between intracellular molecules involved in the adaptive response. The figure highlights the different pathways and main factors involved in autophagy, apoptosis, inflammation, antioxidant, DNA damage, UPR and detoxification response. *AhR* aryl hydrocarbon receptor, *Akt* protein kinase B, *AP1* activator protein 1, *ARE* antioxidant response element, *ATF* activating transcription factor, *ATM* ataxia-telangiectasia mutated, *Atg* autophagy-related, *Bax* Bcl-2-associated X, *Bcl2* B-cell lymphoma 2, *CHOP* C/EBP homologous protein, *ER* endoplasmic reticulum, *GPx* glutathione peroxidase, *IRE1* inositol requiring enzyme 1, *ERSE* ER stress-response element, *IL* interleukin, *JNK* c-Jun N-terminal

kinases, *MAPK* mitogen-activated protein kinase, *mTOR* mechanistic target of rapamycin, *LC3B* light chain 3 $\beta$ , *NF- $\kappa$ B* nuclear factor-kappa B, *NRE* NF- $\kappa$ B response element, *Nrf2* nuclear factor erythroid 2 (NFE2)-related factor 2, *PERK* protein kinase RNA-like ER kinase, *PI3K* phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, *ROS* reactive oxygen species, *SOD* superoxide dismutase, *TLR* toll-like receptors, *TNF* tumor necrosis factor, *TRE* 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) response element, *UPR* unfolded protein response, *UPRE* unfolded protein response element, *XBP-1S* X-box binding protein 1, *XIAP* X-linked inhibitor of apoptosis protein, *XRE* xenobiotic response element

**Table 1** Development of adaptation for several signaling pathways induced by low dose irradiation and chemicals (relevant references indicated)

Signaling pathways	Ionizing radiation types	Chemical compounds
DNA damage repair (p53, ATM, PARP)	$\alpha$ , $\beta$ , X, $\gamma$ [9, 27, 32, 42, 119, 124]	Alkylating agent [29]
Nrf2 antioxidant pathway	$\alpha$ , X [54, 68, 146, 149]	Sulforaphane, heavy metals, thiol [45, 46, 66, 145]
NF- $\kappa$ B inflammatory pathway	$\gamma$ , X [61–63, 65, 67, 153]	Thiol [66]
MAPK (AKT, ERK, JNK) pathway	$\gamma$ , X [73–75, 101]	Alkylating agent [75]
Autophagy	$\gamma$ [87, 88]	CBZ, heavy metals [91, 92]
CyclinB1/CDK1	$\alpha$ , X [102, 124, 186]	Not known
Apoptosis (Bax/Bcl2, Wnt/ $\beta$ catenin)	$\gamma$ [103, 104]	Cd [142]
UPR response	Not known	Nephrotoxin drugs, Pb [112, 114, 115]
Bystander (diffusible factors)	$\alpha$ , $\gamma$ [119, 126]	Cd [140]

[31–33], demonstrating that 3-aminobenzamide blocks it in lymphocytes, and thus suggesting the possible role of repair pathways involving poly(ADP-ribose) polymerase.

Experimental studies have reported the induction of DNA repair mechanisms at low doses of radiation [34]. Others have suggested different factors involved in DNA repair, including DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) and ERCC5 (XPG) [35, 36]. Moreover, ataxia telangiectasia mutated (ATM) and p53 tumor suppressor proteins are involved in both cell cycle regulation and DNA repair [27, 35, 37] (Fig. 2). The results of these experiments highlight the need for p53 in the induction of adaptive responses; no such response occurred in p53-deficient cells, such as Trp53 knockout cells, or immortalized cells, such as AT or m5S cells [27]. Similarly, reduced p53 function in mice exposed to low-dose radiation administered at a low dose rate accelerated disease in the modified compared to control mice (with full p53 function) exposed to the same radiation [38]. Several authors have proposed schematic representations summarizing p53 involvement in conjunction with the molecular network relevant to signal transfers and double-strand break (DSB) repair [27, 39]. Some suggest that adaptive response to low-dose IR in eukaryotic cells may involve DSB repair by non-homologous end joining repair pathways. Several protein kinases are reported to activate p53; among them, low-dose irradiation efficiently activates p38MAPK, which inversely is downregulated at high doses [40] (Fig. 2).

Borham and Mitchel [41] showed that DNA single-strand breaks are more closely associated with radioresistance induction than the DSBs. Hydroxyl radicals derived from the radiolytic decomposition of H<sub>2</sub>O or from reactive nitrogen species strongly induce these single-strand breaks. This finding is consistent with the increases in protein levels of AP-endonuclease (a DNA base excision repair protein) that occur after a low dose of  $\alpha$  particles [42].

### **Nrf2 mechanisms dependent on and independent of the Nrf2/Keap1 pathway**

Oxidative stress can result in the impairment of DNA and other cell components, such as proteins and lipids. This section develops the major pathway described for the adaptive response to oxidative stress: the Nrf2 pathway. Nrf2 plays a role in controlling the inducible expression of various enzymes responsible for the synthesis of glutathione, direct-acting antioxidants, and reducing equivalents [43].

NF-E2-related 2 (Nrf2) is a transcription factor, and activation of the Nrf2-signaling pathway is an adaptive response to environmental and endogenous stresses. This response renders animals resistant to chemicals and other forms of toxicity by inducing a variety of detoxification or antioxidant enzymes, as reviewed by Osborn and Kensler [44]. This factor belongs to the cap'n collar protein family of basic leucine

zipper transcription factors, which bind to the antioxidant responsive element (ARE) and appear essential for maintaining cellular redox balance. Under normal conditions, Keap1 sequesters Nrf2 in the cytoplasm, where Nrf2 then facilitates the degradation of Keap1 via the proteasome.

The Nrf2-antioxidant pathway can be stimulated by irradiation and its preactivation by chemical inducers such as sulforaphane reduce the number of irradiation-induced DNA DSBs [45, 46]. The induction of this protective Nrf2 function by low-dose IR has also been observed in the diabetic mouse model, where it reduces renal inflammation, oxidative damage, remodeling, and dysfunction [47–49]. This group of authors first showed that low-dose radiation prevented diabetic downregulation of both renal Nrf2 expression and the downstream genes NQO1 and HO-1 [47] (Fig. 2, Table 1).

Upregulation of the Nrf2 pathway after low-dose irradiation might also be due to the induction of autophagy. As mentioned below, low-dose irradiation promotes the autophagy process. A deficiency in autophagy results in competitive inhibition of Nrf2-Keap1 binding by the selective autophagy substrate p62 and stabilizes Nrf2 and its downstream pathway [50]. Other studies have demonstrated that autophagy upregulates Nrf2 by its autophagosomal degradation of Keap1 [51] or by upregulation of the oncogene signaling protein and the subsequent induction of the antioxidant pathway [52]. Nrf2 has also been associated with chemoresistance in cancer cell lines. Overexpression of Nrf2 enhances resistance to chemotherapeutic drugs including cisplatin, doxorubicin, and etoposide in breast carcinoma or neuroblastoma cell lines, and downregulation of Nrf2 makes cancer cells more susceptible to these drugs [53]. In 2015, Chen et al. [54] also demonstrated that exposure to 50 mGy of  $\alpha$ -particles induces radioresistance in human lung adenocarcinoma A459 cells after a subsequent exposure to 750 mGy  $\alpha$ -particle radiation. The initial exposure to 50 mGy triggers an increase in the expression of Nrf2 and its target HO-1. These authors used short-hairpin RNA (shRNA) of Nrf2 and a chemical inhibitor of HO-1 to suppress the induced radioresistance of the 50 mGy  $\alpha$ -particle radiation and thereby demonstrate Nrf2 pathway involvement.

Although Nrf2 is primarily regulated via its interaction with Keap1, studies have begun to show that it can be regulated independently of Keap1. Nrf2 phosphorylation by several signal transduction pathways, the involvement of epigenetic factors such as microRNAs (miRNAs), and Nrf2 interaction with other proteins also play a role in its activation [55]. miRNAs can modulate the Nrf2 signaling network either by their involvement in regulating Nrf2 activity (affectors) or by mediating Nrf2 activity (effectors) [56]. At the post-transcriptional level, components of the Nrf2 pathway can be regulated by several miRNAs (miR-28, 34, 144, 200). For example, Wagner et al. [57] showed that decreased levels of miR-155 is correlated with increased Nrf2 expression and



a severe reduction in the expression of the proinflammatory TNF $\alpha$  gene. Nrf2 is also regulated post-transcriptionally by phosphorylation, ubiquitination, and acetylation via a variety of enzymes affecting its interaction with Keap1 (ERK/JNK, PCK, MAPK/ERK, and p38), by its localization (PKC, CK2, and GSK3 $\beta$ /Fyn) in the nucleus or within the proteasome, its degradation (GSK3 $\beta$ / $\beta$ TrCP), or its binding to DNA binding protein (300/CBP, Maf).

Ligands of AhR (aryl hydrocarbon receptor) activate the XRE (xenobiotic responsive element) to induce the expression of many phase I enzymes, such as the cytochrome P450s that produce reactive intermediates able to activate the antioxidant pathway via the ARE (Fig. 2). Some of the products of these Nrf2-regulated enzymes can then activate Nrf2 signaling and thereby potentiate the Nrf2 adaptive response. AhR inducers such as TCDD also induce ROS as well as Nrf2 itself and can, therefore, activate both ARE and XRE pathways [58]. Moreover, Nrf2 possesses an ARE sequence within its own promoter region to enhance the adaptive cell defense response. For example, upregulation of miR-125b through Nrf2 expression regulates the expression of the AhR repressor and thus reduces cisplatin-induced injury [59]. Nrf2 knockout mice consistently abrogate the adaptive increase of miR-125b elicited by cisplatin and thus worsen kidney injury.

This items of evidence shows that the Nrf2 pathway is highly regulated and suggests that a better understanding of the interplay between the pathways involved in cellular processes such as apoptosis, survival, differentiation, and inflammation is essential to clarify the coordinated cell protection that produces adaptation against stressful conditions.

### NF- $\kappa$ B signaling pathway

The NF- $\kappa$ B (nuclear factor-kappa B) family of transcription factors is a master regulator of the both innate and adaptive immune responses [60]. It also controls the expression of genes involved in the repair of damaged DNA and the regulation of molecules that contribute to the control of cell proliferation, survival, or apoptotic cell death (Fig. 2). Numerous studies have shown that NF- $\kappa$ B, by inducing genes involved in proinflammatory processes, plays a proinflammatory role. Simultaneously, however, reports have described its anti-inflammatory role and the induction of leukocyte apoptosis during the resolution of inflammation. The serine/threonine kinase Akt (protein kinase B) pathway is a central node in cell signaling downstream from inflammatory agents or other cell stimuli and appears to be associated with the adaptive response induced by exposure to low doses of IR (Table 1).

Prasad et al. first reported NF- $\kappa$ B activation after low to moderate radiation (0.25–2 Gy) in lymphoblastoid cells [61]; it has since been reported in endothelial cells as well [62].

Both studies observed that NF- $\kappa$ B binding has a biphasic induction profile and reported transcriptional activities with a first peak at 0.5 Gy and a second at 2 Gy. Rodel et al. further showed that the anti-inflammatory properties of low-dose IR may be due to the interrelations between NF- $\kappa$ B and TGF- $\beta$ 1 (transforming growth factor beta1) in exposed endothelial cells [62]. The induction of X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) expression in the same model demonstrates the role of this protein in modulating NF- $\kappa$ B and TGF- $\beta$ 1 expression; both contribute to anti-inflammatory effects and the modulation of apoptosis after low-dose IR [63]. Consistently with this finding, other works have demonstrated that low doses of IR reduce the IL-1 $\beta$  secretion by macrophages that results from reduced expression of RelA (p65), p38 MAPK, and Akt, which are up- and downstream signaling molecules of NF- $\kappa$ B [64] (Fig. 2). Studies also suggest that Akt activity responds differentially to low-dose IR. Kim et al. [65] showed that a 50-mGy exposure stimulates cell proliferation through the transient activation of Raf and Akt but does not change the cell cycle response-related p53 and p21 levels in lung fibroblasts. A 2-Gy dose of IR, however, induces cell cycle arrest by changing these levels.

As described below, the antioxidant enzyme MnSOD is often cited as an important mechanism of the adaptive response to low doses of IR. Increased NF- $\kappa$ B-mediated SOD2 expression (Fig. 2, Table 1), producing a radioadaptive response, has followed thiol treatment or constitutive activation of Akt [66, 67]. Both classes of agents seem to share the same pathway after activation of NF- $\kappa$ B, which reduces the overall damage induced by the IR challenge dose. Nevertheless, they differ in complexity, with the TNF $\alpha$  signaling pathway implicated in the low-dose radiation-induced response, but not in the thiol-induced pathway [68].

### MAPK (ERK/JNK/p38) signaling pathway

The mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade is essential for the transduction of extracellular signals into specific cellular responses such as cell migration and survival and modulate cellular metabolism [69, 70]. Stress-activated MAPK superfamily can be induced by exposure to IR or chemicals and to adapt to these environmental circumstances. These pathways are regulated by a diverse array of intra- and extracellular stressors, including environmental physical/chemical changes and exposure to inflammatory cytokines. Their activation appears to be associated with cell protection against IR and chemicals and with survival of these stressors. Several studies have suggested that extracellular signal-regulating kinase 1/2 (ERK1/2), a member of this superfamily, plays a critical role in determining the cellular outcome—survival or death—after irradiation (Table 1). Low IR doses induce ERK1/2 through ATM, its upstream regulator, whereas high-dose exposure results in

ATM-independent dephosphorylation of ERK1/2, and thus shuts down prosurvival signaling [71]. Experiments using siRNA and chemical inhibitors have demonstrated that the cell proliferation stimulated by low-dose IR occurs through ERK1/2 and p38 in normal human fibroblasts, and thus confirmed the activation of the MAPK pathway in lung fibroblasts exposed to 50 mGy radiation [72].

Studies have also reported that low-dose IR (0.01–0.1 Gy) induces ERK activation in immune lymphoblast cells without altering Akt activation and then induces an adaptive response to a subsequent high-dose radiation challenge (2 Gy) [73]. The authors suggest that activation of the ERK pathway in cells lacking Akt activity is compensatory and might explain the differential sensitivity of non-tumor and tumor cells previously observed by others [74].

Bystander cells exposed to conditioned media from IR-exposed cells (1–2 Gy) or to genotoxic chemicals show transient increases in MAPK phosphorylation [75]. ERK, JNK, and p38 are all activated and then decline and are inhibited, in correlation with a decrease in caspase activity. Asur et al. suggest that activation of ERK and p38 results in the cell cycle arrest of bystander cells and then the activation of proliferative pathways to repair damaged components. Cells that escape repair may then undergo apoptosis through MAPK-mediated pathways.

### Cross-talk between the intracellular pathways

As noted in the previous sections describing molecular activities, several types of relations enable cells to balance between stress responses (e.g., antioxidant, anti-inflammatory, and autophagy) and regulation of either death signals or the cell cycle. Although our understanding about the common hallmarks of these responses remains incomplete at present, they most likely originate from an overlap of

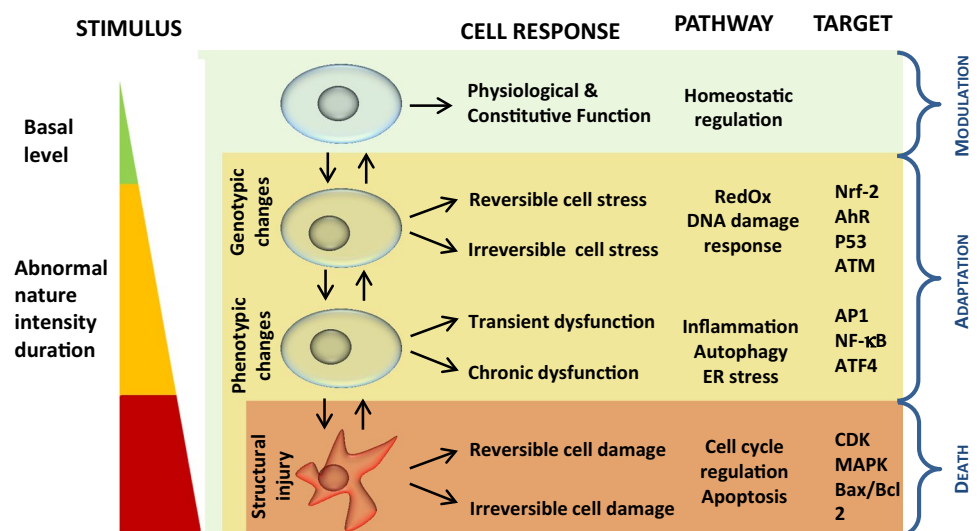
several processes that may be initiated at various thresholds (depending on the pathway) and operate in a staggered manner (Fig. 3).

Among these pathways, Nrf2 is a central transcription factor responsible for the basal and inducible expression of proteins involved in oxidative stress response, xenobiotic metabolism, and cytoprotection, but it is also linked to differentiation, proliferation, growth, and apoptosis. Nrf2-regulated genes include antioxidant enzymes, molecular chaperones, DNA repair enzymes, and anti-inflammatory response proteins. Nrf2 activation can suppress NF- $\kappa$ B activity and thereby inhibit inflammation. Cross-talk between Nrf2 and AhR or Nrf2 and NF- $\kappa$ B, and the identification of XRE- and NF- $\kappa$ B-binding regions of Nrf2 all suggest that its transcription can be regulated by these pathways, as reported in previous sections (Fig. 2).

The link between the autophagy process and antioxidative response is an important component of the adaptive response. Several laboratories have shown various adaptive mechanisms of human lung adenocarcinoma A549 cells exposed to low-dose IR before high-dose radiation and confirmed the association between p62, an autophagy adaptor protein, and Keap1, the regulator of Nrf2 antioxidant transcription factor [55, 76]. The sequestration of Keap1 by p62 allows Nrf2 to upregulate ARE-regulated genes.

Links between the antioxidative factor Nrf2 and the UPR (unfolded protein response) pathway are also necessary to alleviate ROS production in the endoplasmic reticulum (ER) during UPR-increased protein folding. Cullinan et al. showed that the Nrf2 pathway is induced by ER stress in a manner depending on protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) and that it enhances cell survival [77]. Another example is the interaction of the UPR pathway with apoptosis; toll-like receptor 4 (TLR4) inhibits in a TRIF-dependent manner the UPR-induced expression of

**Fig. 3** Schematic representation of the hierarchical cell stress model in response to chemical or physical stress (adapted from [16, 80]). *AhR* aryl hydrocarbon receptor, *ATM* ataxia-telangiectasia mutated, *ATF* activating transcription factor, *Bax* Bcl-2-associated X, *Bcl2* B-cell lymphoma 2, *MAPK* mitogen-activated protein kinases, *NF- $\kappa$ B* nuclear factor-kappa B, *Nrf-2* nuclear factor erythroid 2 (NFE2)-related factor 2



CHOP [78], a protein that leads to apoptosis after prolonged induction [79]. Nevertheless, these last interrelations as well as many other links between stress response pathways have only been shown in mechanistic molecular studies but have not yet been demonstrated in an adaptive response process induced by low-dose exposure to physical or chemical stress.

## Adaptive mechanisms at the cellular level

To maintain a stable intracellular environment, cells can respond to physiological stressors or pathological stimuli in various ways, ranging from the activation of survival pathways to the initiation of cell death. The stress response pathways are evolutionary highly conserved defense mechanisms that determine the cellular response to chemical or physical aggression according to a hierarchical stress model. We present a model adapted from Li et al. [80] (Fig. 3). At the cell level, these cytoprotective processes include autophagy, which enables cell survival by the degradation and recycling of cell components, cell cycle regulation, which orients cells for repair, proliferation, or differentiation, UPR, which allows re-establishment of normal endoplasmic reticulum function, and apoptosis, that is, programmed cell death induced by excess damage. The bystander response is also described in this chapter as it occurs at the cell level and can involve different signaling pathways.

## Autophagy

Autophagy is a housekeeping survival mechanism that promotes programmed cell survival, sustaining homeostasis by maintaining cellular integrity and favoring efficient cellular function; it is thus distinct from, even antagonistic to, apoptosis or programmed cell death [81]. Autophagy is strongly induced by starvation and is a key component of the adaptive response of cells and organisms to nutrient deprivation, by promoting survival until nutrients become available again. It is a nonselective bulk degradative pathway, but also a selective pathway mediated by autophagic adaptor proteins in response to stressful conditions [82]. Its induction by various stimuli (xenobiotics, cytokines, endoplasmic reticulum stress, and oxidative stress) suggests that it plays an essential role in cellular homeostasis and adaptation to adverse environments. Collectively, autophagy antagonizes apoptosis and promotes cell survival via a series of responses to damaged organelles, ER stress, and DNA instability. However, massive and persistent autophagy depletes the cell of organelles and critical proteins and can thus kill severely damaged cells by a caspase-independent form of cell death [83]. Cross-talk between autophagy and apoptosis is manifested by regulatory genes shared with common pathways including p53, Atg5, and Bcl-2 [81, 84].

In organs often exposed to stressful conditions, such as the kidney and liver, autophagy promotes cytoprotection and maintains cellular homeostasis in different cell types through a common mechanism aimed at preventing inflammation, oxidative stress, and apoptosis: the clearance of protein aggregates and unwanted organelles. Autophagy is now accepted to be renoprotective. An increased autophagic flux is observed in renal cell lines and murine models exposed to several nephrotoxins including heavy metals and drugs. The sensitization of kidney cells to hypoxic and ischemia-reperfusion injury by blocking autophagy by knocking out the atg gene suggests autophagy is renoprotective, promoting survival of these kidney cells [85]. Autophagy has also been identified as a critical mechanism for glomerular homeostatic maintenance in response to injuries, contributing to the preservation of structure and function [84]. Autophagy is described increasingly often in vascular diseases such as atherosclerosis, where it is required for endothelial cell alignment and atheroprotection under physiological blood flow [86]. Indeed genetic inactivation of autophagy resulted in major atherosclerosis plaque formation only in areas previously resistant to atherosclerosis, but no increase in the normally atheroprone (low shear stress) areas.

Autophagy can be induced by IR [87–90] or by chemical inducers that confer radioprotective effects [91]. The treatment of hematopoietic cells by carbamazepine before irradiation increases both cell survival, as assessed by clonogenic survival, and autophagy, assayed by immunoblot for microtubule-associated protein light chain 3 (LC3) [91]. Paglin et al. [87] showed that the formation of acidic vesicular organelles and autophagy in surviving colonies of cell lines exposed to IR provide long-term protection against damage from low-dose radiation. Exposure to low-dose IR (50 mGy) can also stimulate the autophagy process through the Nrf2 antioxidant pathway. Blockade of the autophagy pathway by an inhibitor suppresses radioresistance and the induction of Nrf2 and HO-1 expression, findings indicating that autophagy mediates Nrf2 upregulation [54].

Exposure to heavy metals at low (subtoxic) doses has also been shown to trigger cell proliferation and autophagy [92]. This study unraveled the unexpected early upregulation of autophagy in 80% of cadmium (Cd)-treated proximal convoluted tubules *in vivo* (< 10  $\mu$ M), without induction of apoptosis or tubular dysfunction. Induction of endoplasmic reticulum stress was also observed in this study. The authors concluded that autophagy can serve as an early adaptive mechanism but that continuous activation of this process due to cadmium persistence might impair its efficiency and lead to nephrotoxicity in the long term.

In other diseases, such as neuropathies and ischemic heart diseases, autophagy is more widely accepted as beneficial given its role in eliminating “toxic assets” and promoting

cell viability. Thus, autophagy has emerged as a new and potent modulator of disease progression.

### Cell cycle regulation and apoptosis

The cellular machinery of the cell cycle is controlled by serine/threonine protein kinases, which are the cyclin-dependent kinases (CDK). They can stop the cell cycle at different steps if the genome is altered and cause either its repair or apoptosis. The Wnt/ $\beta$ -catenin pathway plays a critical role in cellular development, survival, proliferation, etc. [93, 94], but the role of this pathway in adaptive response and particularly in immunity is beginning to become more well-defined [95]. The regulatory function of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling is increased after low dose exposure to ionizing radiation. Indeed, it was shown that low level of irradiation promotes the bone marrow stromal cells through the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway [96].

The role of cell cycle regulators of the mitochondrial functions enabling radiation-induced adaptive responses at low doses has been reviewed recently [97]. The authors concluded that the Cyclin B1/CDK1 complex, which is the cell cycle G2/M checkpoint regulator, may be considered a key harmonizer for the regulation of mitochondrial functions in cellular adaptive response to genotoxic stress, including low-dose IR. This kinase complex is one of the main components by which cells communicate with mitochondria under stressing conditions; it plays an important role in coordinating mitochondrial energy production related to cell cycle progression and adaptive response to genotoxic stress. Induced radioadaptation has been reported at doses below 0.6 Gy and attributed to a change in the balance of G2/M checkpoint induction that allows time for DNA repair and increases cell survival. Several studies have demonstrated that low-dose radiation induces an adaptive response via stimulation of normal cell proliferation but does not induce a radioadaptive response in tumor cells [73, 74].

Apoptosis is a physiological process of endogenous programmed cell death, mediated by a variety of endogenous and exogenous stimuli including IR. Some miRNAs have been shown to be involved in radioresponsive effects at either high or low doses [98]. These authors suggest a model in which miRNAs may act as “hub” regulators of specific cellular responses, by immediately down-regulating them to stimulate DNA repair mechanisms and then upregulating those involved in suppressing apoptosis for cell survival. They further suggest that among the miRNAs identified miR-608 may contribute to cell cycle arrest. Others have confirmed the decreased apoptosis after low-dose IR and demonstrated it with UV radiation as well [99–101]. Irradiation of human breast epithelial MCF10A cells at 100 mGy produces MnSOD phosphorylation through CyclinB1/CDK1 and then increases resistance to apoptosis induced by a

challenge dose of 10 Gy [102]. In human myeloid cells, low-dose irradiation confers some protection against the induction of apoptosis [103]. Microarray analysis of these cells has identified low-dose inducible genes with known roles in apoptosis regulation and cell cycle regulation. Thus, low-dose  $\gamma$ -radiation modifies apoptotic-related gene expression in freshly isolated blood lymphocytes, inducing upregulation of Bcl-2, an anti-apoptotic molecule and down-regulation of Bax, a pro-apoptotic gene [104].

Neurogenesis is another process that may be enhanced by low-dose irradiation [105]. Wei and coauthors related the stimulation of neural stem cell proliferation and reduced neuronal apoptosis in the hippocampus and learning by mice to stimulation of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway by 0.3 Gy radiation, whereas they confirmed deleterious effects after a dose of 3 Gy.

### The unfolded protein response (UPR)

The ER is the major cell organelle for the synthesis, folding, and sorting of proteins. The UPR is a protective mechanism for adaptation to environmental stress and recovery of normal ER function. The role of the UPR is to modify cellular functions in response to ER stress and re-establish ER function, by reducing messenger RNA translation, increasing proteasomal degradation, and increasing protein-folding capacity [106, 107]. Under prolonged or unresolvable ER stress, the UPR switches from an adaptive to an apoptotic role. Numerous studies suggest that ER stress and UPR are involved in several pathological situations (ischemia, diabetes, neurodegenerative and renal disorders, and chemical-induced tissue injury) and physiological events (development of different cell types and cytoprotection) [108]. If UPR fails, apoptosis begins. Numerous and widely varied chemicals that perturb calcium signaling, induce ROS production or hypoxia, or deplete amino acids are known to activate the UPR [109, 110]. The ER is one of the main reservoirs of calcium in the cell, and some divalent metals including lead may replace endogenous divalent cations. It has been reported that lead or cadmium induces ER stress and the corresponding GRP94 and GRP78 calcium-binding chaperones [109]. Knockdown of the latter protein results in an increase in both ROS generation and lead cytotoxicity [111]. The authors suggested that these two ER chaperones (GRP94 and GRP78), as well as the UPR response, may function as a defense mechanism against lead toxicity in coordination with antioxidant enzyme induction.

In addition to its pathological significance, ER stress/UPR also has physiological and protective effects, as shown, for example, by the cytoprotection of renal cell lines after ER stress by clinically relevant nephrotoxins that induce GRP78 and GRP94 [112]. These results have been confirmed in vitro and in vivo by other authors who have demonstrated

that some ER stress inducers, such as heavy metals or pharmacological compounds, trigger UPR, upregulate GRP78, and then activate the autophagy pathway [113–115]. In vivo, these actions result in reducing renal ischemia-reperfusion injury through the improvement of renal function and histology [114]. In vitro binding assays investigating the molecular mechanism show that PERK can directly bind Nrf2 and that tunicamycin, a UPR-inducing agent, triggers Nrf2-DNA binding. Nrf2 is phosphorylated during ER stress responses, thus triggering Nrf2 nuclear import in murine fibroblasts, whereas Nrf2 remains cytoplasmic in PERK<sup>-/-</sup> cells [77].

### The bystander effect

The bystander effect is a biological/biochemical change expressed by a cell or a tissue that is not directly targeted by IR or chemicals; it happens to cells neighboring or even distant from targeted cells. It was first demonstrated by Nagasawa and Little [116], who found that although  $\alpha$ -particles traversed less than 1% of the nuclei of a monolayer cell culture, 30% of the cells showed increased frequencies of sister chromatid exchanges.

Radiation-induced bystander effects refer to DNA damage-like responses in cells that have not been directly exposed to radiation [117, 118]. Matsumoto reviewed the interrelation between bystander effects and radioadaptive response in 2007 [10]. A more recent finding is that unexposed bystander cells respond to factors released by targeted cells, and thus produce specific responses that can be either deleterious or beneficial [28]. The induction of radioadaptive responses in bystanders depends on the cell type and experimental conditions. Cells that are grown in conditioned medium harvested from cells exposed to low doses of  $\alpha$ -particles or  $\gamma$ -rays display increased clonogenic survival after subsequent exposures to radiation [42, 119]. This phenomenon has also been observed in vivo and appears to resemble abscopal effects, defined as radiation responses in tissues “definitively separate” from the irradiated area [120]. Specific irradiation of human tumor cells in vivo produces a bystander effect in subcutaneously growing tumors [121, 122].

The two main types of intercellular signaling pathways identified as producing radiation-induced bystander responses [123] occur through either cell-cell contact (gap-junction intercellular communication) [124, 125] or secreted diffusible factors (e.g., cytokines, ROS, and miRNAs) [126, 127]. Low-dose irradiation can induce the selective removal of precancerous cells via intercellular induction of apoptosis. The use of scavengers and inhibitors confirms the involvement of secreted diffusible factors such as cytokines and reactive oxygen/nitrogen species signaling in the selective removal of transformed cells by non-transformed cells in coculture [128]. Nitric oxide (NO) from irradiated cells acts as

an intercellular signaling molecule to initiate and activate the early steps in the bystander response process after low-dose irradiation [129]. Epigenetic elements such as DNA methylation may also play a role in regulating low-dose radiation effects through the bystander effect [98, 130]. DNA methylation regulates low-dose response through reduction of DNA methyltransferases and global DNA methylation in bystander tissues [131] and may inhibit DNA repair [132]. Several data suggest that miRNA changes may have a protective effect after radiation exposure [133]. Recently studies of their role in the bystander response showed that expression levels of some miRNAs, such as miR-21, are modified by fibroblast irradiation and may act on non-irradiated cells [134, 135].

Until recently it has been difficult to demonstrate a bystander response for chemical exposures because treatments expose all cells simultaneously. Nevertheless, new in vitro experimental models have demonstrated the ability of genotoxic agents or chemotherapeutic drugs to induce bystander effects [136–139]. These effects are, therefore, not specific to IR, and authors have suggested novel mechanisms by which chemotherapeutic agents act on cancer cells. Chemically induced adaptive responses have also been demonstrated in vivo in rats pretreated with low doses of cadmium that induce hepatic metallothionein and produce an adaptive tolerance to lethality from a subsequent high dose [140].

### Adaptive mechanisms at the tissue and organism levels

Some biological systems sustain and maintain normal physiology in the organism in response to low or mild-stress. These include antioxidant and immune/inflammatory systems, which are particularly active in detoxifying organs such as the kidneys, lung, and liver as well as the vascular system. They sustain and maintain normal physiology in the body in response to such mild stress and protect against toxicity induced by chemicals or radiation. These systems include the adaptive response provided by transporters, but as this is well described in other studies and is specific to chemical exposure, including endocrine disruptors [141], this review will not describe it specifically.

### The antioxidant response

The antioxidant defense system is a key factor that prevents oxidative stress due to by exogenous stress. Mitochondria and ROS appear important to the coordination and regulation of the adaptive response. Because we described the specific role of the Nrf2 pathway above, a more general response by antioxidant enzymes is described here.

The mechanisms of adaptive response have been identified for exposure to heavy metals such as Cd; they involve the induction of metallothioneins (by 10- to 50-fold) after low concentration (< 10  $\mu$ M) Cd pretreatment of rats [140]. The works of Nair et al. [142] confirmed these results and showed that the chronic exposure of rats to low doses of Cd induces protective mechanisms including the expression of genes for antioxidant enzymes and mitochondrial biogenesis factors. Similarly, we have showed that chronic uranium exposure appears to reinforce the antioxidant system in kidneys, glutathione homeostasis in particular [143]. Uranium is also a heavy metal and a radionuclide known to be nephrotoxic after acute exposure. Chronic exposure at low doses failed to produce nephrotoxic effects but did induce an antioxidative response [143, 144]. These findings suggest that the kidney adapts to uranium during the chronic exposure. Other heavy metals, such as Hg, Cu, or Pb, may produce protective effects at low concentrations by increasing the expression of antioxidant enzymes, according to Korashy and El-Kadi [145], who hypothesize that Pb can replace Zn in the metal-binding site of Keap 1, thereby activating Nrf2 and its downstream proteins HO-1, NQO1, or GSTA1.

High-dose irradiation is particularly known to deactivate antioxidative functions and lead to ROS-induced damage in cells and tissues, while low-dose irradiation or radon inhalation activates antioxidative functions and inhibits ROS-induced damage in *in vivo* studies [146]: enhanced antioxidative functions have been shown in the brain, lungs, liver and kidneys of mice inhaling radon [146], while low-dose  $\gamma$ -irradiation before or after carbon tetrachloride treatment activates antioxidative functions as an adaptive response in mouse liver and inhibits hepatopathy [147, 148]. The activity of detoxification enzymes such as MnSOD, Catalase, Gpx, and GST has also been reported to rise in cells exposed to low-dose radiation, and thus reduce cell damage [68, 149]. Glutathione content rises after 500 mGy irradiation along with other antioxidants in the liver of mice or in macrophage-like cell lines; this might contribute to a radioadaptive response. Nrf2 plays a role in controlling the inducible expression of various enzymes responsible for the synthesis of glutathione, direct-acting antioxidants, and reducing equivalents.

### Immune/inflammatory reactions

Inflammation is a protective response by cells to pathogens, infections, or tissue damage and serves to destroy or wall off both the injurious agent and the injured tissue. It involves the coordinated communication between different immune cells and blood vessels through an intricate cascade of molecular signals designed to remove the stimulus or initiate the healing process. Observations of changes in the immune system after radiation exposure imply that inflammation might also

play an essential role in the immunocompetence of living organisms [150]. Recent reviews of several experimental findings reveal that low-dose radiation induces anti-inflammatory properties and may thereby protect against inflammatory diseases [151, 152]. Chronic exposure to low-dose radiation of different wild-type mouse strains may stimulate effects that activate the immunological network of the entire body including cell populations and their surface molecules, together with antibody-producing activity [153].

It has been reported that under protracted chronic exposure to low-dose  $\gamma$ -rays, the normally highly radiosensitive hematopoietic system adapts and becomes radioresistant [150, 153, 154]. Evidence from animal experiments demonstrates that low dose rate irradiation can activate the immune function [155], promoted by enhancement of the proliferative response of splenic and thymic lymphocytes to mitogens, amplification of NK activity, and increased secretion of cytokines that regulate immune cells. Repeated low-dose IR (six fractions of 100 mGy) also enhances other immune cells or animal models. Kojima et al. [147] observed intensified natural killer activity and antibody-dependent cellular cytotoxicity correlated with the increase in the glutathione level and the suppression of tumor growth in Ehrlich-Solid-Tumor-bearing mice. *In vitro*, low-dose irradiation is described as activating macrophage cells towards a pro-inflammatory phenotype [156]. Nonetheless, decreased inflammatory cytokine production, reduced migration, and increased chemotaxis in macrophages have also been observed [157]. A recent study by our group showed the importance of dose rate on endothelial cells' molecular and functional responses; upregulation of antioxidant and anti-inflammatory gene expression after chronic low dose rate exposure (6 mGy/h) produced an adaptive response even when the dose reached 2 Gy [158].

Accordingly, the effect of mild stressors such as low-dose irradiation has modulatory anti-inflammatory properties that have been used in preclinical models of low-dose radiotherapy. *In vivo* models of induced arthritis treated by fractions of irradiation (1–1.5 Gy) are reported to diminish inflammatory proliferation symptoms, and thus joint swelling [159–161]. In further studies, histological analysis of arthritic joints revealed a reduction in clinical symptoms (cartilage and bone destruction) after local irradiation, apparently related to a reduction of iNOS activity and increased expression of heme oxygenase-1 and Hsp70 [162, 163]. Reduced levels of the inflammatory cytokines TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , and IL-6 are associated with an improvement in clinical symptoms in another model of induced arthritis in mice, treated by 0.5-Gy per week for five consecutive weeks [164]. Regulatory T cells (Treg) may thus contribute to reducing clinical symptoms in mice treated with low-dose irradiation [165]. In a human TNF-transgenic mouse model of chronic polyarthritis characterized by synovial

inflammation, low-dose irradiation of the mice improves the disease's clinical progression [166].

The therapeutic effect of low-dose radiation is also observed in diabetic nephropathy. In a type 2 diabetes mouse model, repeated exposure to low-dose radiation at 25 mGy attenuates diabetes-induced higher renal levels of ICAM-1, TNF- $\alpha$ , and PAI-1, three proinflammatory factors involved in the pathogenesis of kidney failure [48]. These results are in line with previous animal studies showing that low-dose radiation modifies the progression of chronic renal failure [167]. As discussed before, the protective mechanisms of enhancing immunity are linked to the antioxidative action of low-dose radiation [168, 169]. Along with inflammation, oxidative stress is a common feature in chronic kidney diseases; in experimental animals, the ablation of the Nrf2 gene, a critical regulator of cytoprotective factors, causes a lupus-like autoimmune nephritis and exacerbates diabetes-induced oxidative stress, inflammation, and nephropathy [170, 171].

The regulation of inflammation in the cells of the vascular tree or other organs often involves an adaptive response by the immune system, associated with an increase in T-reg cells, which control autoreactive T cells and negatively regulate immune response by decreasing proinflammatory lymphocytes and monocytes. Upregulation of T-reg cells is also associated with a decrease in IL-6, which inhibits their production through the action of TGF $\beta$  [172]. In fact, increasing the number of T-reg cells is an adaptive response used by different types of tissue as an immune evasion strategy [173]. In this context, repeated exposure to low-dose mild stressors attenuates inflammation, and upregulate the immunosuppressive T-reg cells response [164, 174].

Moreover, inflammation is a hallmark of several cardiovascular disorders, atherosclerosis in particular. It can be described as a chronic inflammatory disease of the arterial wall in which plaque build-up in the intima impairs normal vascular functioning. High doses of IR increase inflammation and atherosclerosis [175–177], while low doses administered at a low dose rate are anti-inflammatory and reduce atherosclerosis in most situations [67, 178–180]. Recent studies demonstrate the importance of dose rate in the inflammatory response: high dose rates are associated with the upregulation of inflammation, whereas low dose rates induce anti-inflammatory responses [175, 178]. The latter study showed that chronic low-dose  $^{137}\text{Cs}$  exposure for 6 months reduces levels of the inflammatory mediators CRP, TNF $\alpha$ , MCP-1, and IFN- $\gamma$ , as well as plaque macrophage content, results that suggest increased plaque stability.

Lung inflammation by benzo[a]pyrene (BaP), a component of cigarette smoke, induces lung tumors in animal models. When human lung fibroblasts were used to study the effect of low-dose radiation on these proinflammatory effects, a single low dose of 90 mGy inhibited the secretion

of proinflammatory cytokines (IL-6, CXCL1, and CXCL5), probably due to the suppression of IL-6/IL-6R and CLF1/CNFTR signaling [181]. The authors suggest that low-dose  $\gamma$ -ray exposure suppresses the transformation of human bronchial epithelial cells exposed to BaP by suppressing cytokine secretion. Similarly, the arrest of cancer-facilitating inflammation is a plausible explanation for the reduction of the number of lung tumors by low-dose total body irradiation after their induction by BaP exposure [182].

All these findings indicate that the immune system is modified after low dose exposure to IR or chemicals; the extent and impact of this modification depend on factors such as the IR dose and its temporal relation to the immune system. At low doses and low dose rates, the effects of IR on the immune system may be suppressive or stimulatory, and their long-term impact may have consequences on various human inflammatory pathologies.

## Discussion

The biological effects of low doses of radiation or chemicals are often controversial, in view of the difficulty in detecting noticeable low-level effects or rare events in humans in the short term, despite the great importance of and interest in their long-term biological effects. The development of more sensitive assays is improving the detection of these biological effects at low doses and our understanding of the mechanisms involved. Nevertheless, these effects can include maladaptive responses that may appear beneficial in the short term but may be deleterious over the long term. More specifically, carcinogenesis is an adaptive response process in a given tissue and must thus be understood biologically from its early stages, including DNA repair, tumor promotion, and inflammation. It may, therefore, play an important role in preventing the immortalization of human cells. The study and understanding of the mechanisms involved in the adaptive response are highly complex as they depend on the model (in vitro, in vivo) used, the endpoint, the dose or the dose rate for radiation, and the interval between exposure and the observed biological effects. Additionally, the duration of the adaptive response can also differ strongly: enzymatic or transcription responses act within minutes or hours) to remodeling, epigenetic, or genomic effects that are observed after months or years [22]. Accordingly, the adaptive response fades if the time between the first and second exposure is too long; inversely, if these exposures follow each other too rapidly, adaptive response mechanisms may not have sufficient time to be induced.

Although some recent epidemiological studies have found significantly elevated risks of solid cancers associated with exposure in the 0–100 mGy dose range, their statistical power remains too limited to investigate risks in the

low-dose range with sufficient precision [1]. The biological effects of low-dose radiation or chemicals are currently estimated with the linear non-threshold model, but as EJ Calabrese wrote: “Regulators must extrapolate results not only from animal toxicity studies, typically from mice and/or rats to humans, but also from the very high doses usually used in animal experiments to the very low doses that are characteristic of human exposure. These two types of extrapolation are steeped in uncertainty”. Calabrese and Baldwin have proposed a quantitative methodology with scoring criteria for beneficial hormetic effects [183]; it has been applied by others to all NMDR for chemicals [8], modified to include a stepwise decision tree to consider individual NMDR relations in a risk assessment context. This is particularly useful for determining the potential impacts of endocrine disrupting chemicals for which NMDR relations have been experimentally described with relatively higher frequency than for other chemicals [141].

Improving our understanding of these biological consequences is essential for protection of humans and their environment, as it will enable better risk estimates, the revision of standards, and, as some authors suggest, translational applications for new therapies. The neurogenic effects of low-dose radiation have led to the exploration of neurodegenerative disorders. Wei and colleagues, for example, showed that parameters reflecting hippocampal neurogenesis and animal learning both increased in the group exposed to low-dose radiation, but confirmed a detrimental effect on neurogenesis in the high-dose group [105]. An evaluation of the protective mechanisms of low-dose radiation in an animal model of type 2 diabetes-induced kidney injury showed that low-dose radiation attenuates dyslipidemia, inflammation, oxidative stress, and fibrosis—that is, the causes of renal damage in type 2 diabetes [47, 48]. Moreover, the anti-inflammatory effect of low-dose radiation may protect against other inflammatory diseases, such as arthritis symptoms [151]. Single or fractional administration of low-dose radiation also diminishes inflammatory proliferation (cytokines, iNOS) and is associated with improvement in clinical symptoms (cartilage and bone destruction).

## Conclusion

This review shows the importance of studying low-dose effects while avoiding extrapolations from high-dose studies, which are not sufficient for estimating the real consequences of low-dose exposures. A better understanding of these low-dose effects is underway, through molecular studies that allow us to identify the pathways responsible for the adaptive mechanisms. DNA repair and antioxidative mechanisms are among the best described pathways involved in adaptive response to exposure to low doses of radiation

or chemicals. Their interplay with autophagy, inflammatory responses, and UPR can allow the cells to cope with mild stress through a better functional response leading to a higher likelihood of cell survival. If this protection is insufficient and defense mechanisms are overwhelmed, cell death or neoplastic transformation can be observed. In the coming years, a better understanding of the stress response pathway, molecular pathways of toxicity, and the adverse outcome pathway (AOP) will all be helpful in linking the cellular stress response to organ dysfunction and the risk of an adverse effect on the organism [184].

**Acknowledgements** We apologize to the many scientists whose work we were not able to credit due to space restrictions. We thank Joan Francesc Barquinero Estruch (Universitat Autònoma de Barcelona), Klervi Leuraud, Karine Tack and Dominique Laurier (Department of research on the biological and health effects of ionizing radiation, IRSN) for helpful comments and suggestions and Marc Benderitter (Department of research in radiobiology and regenerative medicine, IRSN) for initial discussions on this topic.

## Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare they have no conflict of interest.

## References

1. BEIRVII (2006) Health risks from exposure to low levels of ionizing radiation. Committee to Assess Health Risks from Exposure to Low Levels of Ionizing Radiation, National Research Council (U.S.). The National Academies Press
2. Acad. Sci. (Paris) (2005) Dose-effect relationship and estimation of the carcinogenic effects of low doses of ionizing radiation. Joint Report of the Académie des Sciences (Paris)—Académie Nationale de Médecine
3. UNSCEAR (2012) Biological mechanisms of radiation actions at low doses—a white paper to guide the Scientific Committee’s future programme of work. United Nations, New York
4. UNSCEAR (2008) United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. Sources and Effects of Ionizing Radiation. Volume I: Report to the General Assembly, Scientific Annexes A and B; Volume II: Scientific Annexes C, D and E. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. UNSCEAR 2008 Report. United Nations Sales publications E.10.XI.3. United Nations, New York
5. Tang FR, Loke WK (2015) Molecular mechanisms of low dose ionizing radiation-induced hormesis, adaptive responses, radioreistance, bystander effects, and genomic instability. *Int J Radiat Biol* 91(1):13–27. <https://doi.org/10.3109/09553002.2014.937510>
6. Heidenreich WF, Paretzke HG, Jacob P (1997) No evidence for increased tumor rates below 200 mSv in the atomic bomb survivors data. *Radiat Environ Biophys* 36(3):205–207
7. Hoel DG, Li P (1998) Threshold models in radiation carcinogenesis. *Health Phys* 75(3):241–250
8. Lagarde F, Beausoleil C, Belcher SM, Belzunces LP, Emond C, Guerbet M, Rousselle C (2015) Non-monotonic dose-response relationships and endocrine disruptors: a qualitative



- method of assessment. *Environ Health* 14:13. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-14-13>
9. Olivieri G, Bodycote J, Wolff S (1984) Adaptive response of human lymphocytes to low concentrations of radioactive thymidine. *Science* 223(4636):594–597
  10. Matsumoto H, Hamada N, Takahashi A, Kobayashi Y, Ohnishi T (2007) Vanguard of paradigm shift in radiation biology: radiation-induced adaptive and bystander responses. *J Radiat Res* 48(2):97–106
  11. Feinendegen LE, Brooks AL, Morgan WF (2011) Biological consequences and health risks of low-level exposure to ionizing radiation: commentary on the workshop. *Health Phys* 100(3):247–259. <https://doi.org/10.1097/HP.0b013e31820a83ae>
  12. Calabrese EJ, Baldwin LA (2003) Hormesis: the dose-response revolution. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43:175–197. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.43.100901.140223>
  13. Tubiana M, Feinendegen LE, Yang C, Kaminski JM (2009) The linear no-threshold relationship is inconsistent with radiation biologic and experimental data. *Radiology* 251(1):13–22. <https://doi.org/10.1148/radiol.2511080671>
  14. Pallet N, Anglicheau D, Thervet E (2009) Autophagy is an adaptative mechanism against endoplasmic reticulum stress. *Nephrol Dial Transplant* 24(12):3891. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfp518> (author reply 3891)
  15. Barouki R (2010) Linking long-term toxicity of xenochemicals with short-term biological adaptation. *Biochimie* 92(9):1222–1226. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.02.026>
  16. Andreau K, Leroux M, Bouharrour A (2012) Health and cellular impacts of air pollutants: from cytoprotection to cytotoxicity. *Biochem Res Int* 2012:493894. <https://doi.org/10.1155/2012/493894>
  17. UNSCEAR (1994) Sources and effects of ionizing radiation, United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. Report to the General Assembly, with Scientific Annexes. ANNEX B, Adaptive responses to radiation in cells and organisms. United Nations, New York
  18. Calabrese EJ, Baldwin LA (2001) The frequency of U-shaped dose responses in the toxicological literature. *Toxicol Sci* 62(2):330–338
  19. Szumiel I (2015) Ionizing radiation-induced oxidative stress, epigenetic changes and genomic instability: the pivotal role of mitochondria. *Int J Radiat Biol* 91(1):1–12. <https://doi.org/10.3109/09553002.2014.934929>
  20. Tapio S, Jacob V (2007) Radioadaptive response revisited. *Radiat Environ Biophys* 46(1):1–12. <https://doi.org/10.1007/s00411-006-0078-8>
  21. Rigaud O, Moustacchi E (1996) Radioadaptation for gene mutation and the possible molecular mechanisms of the adaptive response. *Mutat Res* 358(2):127–134
  22. Stijns MM, Weseler AR, Bast A, Haenen GR (2016) Time in redox adaptation processes: from evolution to hormesis. *Int J Mol Sci* 17(10):1649. <https://doi.org/10.3390/ijms17101649>
  23. Calabrese EJ (2013) Hormetic mechanisms. *Crit Rev Toxicol* 43(7):580–606. <https://doi.org/10.3109/10408444.2013.808172>
  24. Jennings P, Limonciel A, Felice L, Leonard MO (2013) An overview of transcriptional regulation in response to toxicological insult. *Arch Toxicol* 87(1):49–72. <https://doi.org/10.1007/s00204-012-0919-y>
  25. Wink S, Hiemstra S, Huppelschoten S, Danen E, Niemeijer M, Hendriks G, Vrieling H, Herpers B, van de Water B (2014) Quantitative high content imaging of cellular adaptive stress response pathways in toxicity for chemical safety assessment. *Chem Res Toxicol* 27(3):338–355. <https://doi.org/10.1021/tx4004038>
  26. Harper JW, Elledge SJ (2007) The DNA damage response: ten years after. *Mol Cell* 28(5):739–745. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.11.015>
  27. Sasaki MS, Ejima Y, Tachibana A, Yamada T, Ishizaki K, Shimizu T, Nomura T (2002) DNA damage response pathway in radioadaptive response. *Mutat Res* 504(1–2):101–118
  28. Nenoï M, Wang B, Vares G (2015) In vivo radioadaptive response: a review of studies relevant to radiation-induced cancer risk. *Hum Exp Toxicol* 34(3):272–283. <https://doi.org/10.1177/0960327114537537>
  29. Samson L, Schwartz JL (1980) Evidence for an adaptive DNA repair pathway in CHO and human skin fibroblast cell lines. *Nature* 287(5785):861–863
  30. Barquinero JF, Barrios L, Caballin MR, Miro R, Ribas M, Subias A, Egozcue J (1995) Occupational exposure to radiation induces an adaptive response in human lymphocytes. *Int J Radiat Biol* 67(2):187–191
  31. Joiner MC, Lambin P, Marples B (1999) Adaptive response and induced resistance. *C R Acad Sci III* 322(2–3):167–175
  32. Wiencke JK, Afzal V, Olivieri G, Wolff S (1986) Evidence that the [3H]thymidine-induced adaptive response of human lymphocytes to subsequent doses of X-rays involves the induction of a chromosomal repair mechanism. *Mutagenesis* 1(5):375–380
  33. Wolff S (1992) Failla memorial lecture. Is radiation all bad? The search for adaptation. *Radiat Res* 131(2):117–123
  34. Le XC, Xing JZ, Lee J, Leadon SA, Weinfeld M (1998) Inducible repair of thymine glycol detected by an ultrasensitive assay for DNA damage. *Science* 280(5366):1066–1069
  35. Coleman MA, Yin E, Peterson LE, Nelson D, Sorensen K, Tucker JD, Wyrobek AJ (2005) Low-dose irradiation alters the transcript profiles of human lymphoblastoid cells including genes associated with cytogenetic radioadaptive response. *Radiat Res* 164(4 Pt 1):369–382
  36. Takahashi A, Asakawa I, Yuki K, Matsumoto T, Kumamoto M, Kondo N, Ohnishi K, Tachibana A, Ohnishi T (2002) Radiation-induced apoptosis in the scid mouse spleen after low dose-rate irradiation. *Int J Radiat Biol* 78(8):689–693. <https://doi.org/10.1080/09553000210132306>
  37. Nosel I, Vaurijoux A, Barquinero JF, Gruel G (2013) Characterization of gene expression profiles at low and very low doses of ionizing radiation. *DNA Repair (Amst)* 12(7):508–517. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2013.04.021>
  38. Mitchel RE (2015) Adaption by low dose radiation exposure: a look at scope and limitations for radioprotection. *Dose Response*. <https://doi.org/10.2203/dose-response.14-025.mitchel>
  39. Wang X, Ohnishi T (1997) p53-dependent signal transduction induced by stress. *J Radiat Res* 38(3):179–194
  40. Shimizu T, Kato T Jr, Tachibana A, Sasaki MS (1999) Coordinated regulation of radioadaptive response by protein kinase C and p38 mitogen-activated protein kinase. *Exp Cell Res* 251(2):424–432. <https://doi.org/10.1006/excr.1999.4582>
  41. Boreham DR, Mitchel RE (1991) DNA lesions that signal the induction of radioresistance and DNA repair in yeast. *Radiat Res* 128(1):19–28
  42. Iyer R, Lehnert BE (2002) Alpha-particle-induced increases in the radioresistance of normal human bystander cells. *Radiat Res* 157(1):3–7
  43. Lee JM, Li J, Johnson DA, Stein TD, Kraft AD, Calkins MJ, Jakel RJ, Johnson JA (2005) Nrf2, a multi-organ protector? *FASEB J* 19(9):1061–1066. <https://doi.org/10.1096/fj.04-2591h.yp>
  44. Osburn WO, Kensler TW (2008) Nrf2 signaling: an adaptive response pathway for protection against environmental toxic insults. *Mutat Res* 659(1–2):31–39. <https://doi.org/10.1016/j.mrrrev.2007.11.006>

45. Khan NM, Sandur SK, Checker R, Sharma D, Poduval TB, Sainis KB (2011) Pro-oxidants ameliorate radiation-induced apoptosis through activation of the calcium-ERK1/2-Nrf2 pathway. *Free Radic Biol Med* 51(1):115–128. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.03.037>
46. Mathew ST, Bergstrom P, Hammarsten O (2014) Repeated Nrf2 stimulation using sulforaphane protects fibroblasts from ionizing radiation. *Toxicol Appl Pharmacol* 276(3):188–194. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2014.02.013>
47. Xing X, Zhang C, Shao M, Tong Q, Zhang G, Li C, Cheng J, Jin S, Ma J, Wang G, Li X, Cai L (2012) Low-dose radiation activates Akt and Nrf2 in the kidney of diabetic mice: a potential mechanism to prevent diabetic nephropathy. *Oxid Med Cell Longev* 2012:291087. <https://doi.org/10.1155/2012/291087>
48. Shao M, Lu X, Cong W, Xing X, Tan Y, Li Y, Li X, Jin L, Wang X, Dong J, Jin S, Zhang C, Cai L (2014) Multiple low-dose radiation prevents type 2 diabetes-induced renal damage through attenuation of dyslipidemia and insulin resistance and subsequent renal inflammation and oxidative stress. *PLoS One* 9(3):e92574. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092574>
49. Zhang C, Xing X, Zhang F, Shao M, Jin S, Yang H, Wang G, Cui J, Cai L, Li W, Lu X (2014) Low-dose radiation induces renal SOD1 expression and activity in type 1 diabetic mice. *Int J Radiat Biol* 90(3):224–230. <https://doi.org/10.3109/09553002.2014.877174>
50. Komatsu M, Kurokawa H, Waguri S, Taguchi K, Kobayashi A, Ichimura Y, Sou YS, Ueno I, Sakamoto A, Tong KI, Kim M, Nishito Y, Iemura S, Natsume T, Ueno T, Kominami E, Motohashi H, Tanaka K, Yamamoto M (2010) The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nat Cell Biol* 12(3):213–223. <https://doi.org/10.1038/ncb2021>
51. Taguchi K, Fujikawa N, Komatsu M, Ishii T, Unno M, Akaike T, Motohashi H, Yamamoto M (2012) Keap1 degradation by autophagy for the maintenance of redox homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 109(34):13561–13566. <https://doi.org/10.1073/pnas.1121572109>
52. DeNicola GM, Karreth FA, Humpton TJ, Gopinathan A, Wei C, Frese K, Mangal D, Yu KH, Yeo CJ, Calhoun ES, Scrimieri F, Winter JM, Hruban RH, Iacobuzio-Donahue C, Kern SE, Blair IA, Tuveson DA (2011) Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. *Nature* 475(7354):106–109. <https://doi.org/10.1038/nature10189>
53. Wang XJ, Sun Z, Villeneuve NF, Zhang S, Zhao F, Li Y, Chen W, Yi X, Zheng W, Wondrak GT, Wong PK, Zhang DD (2008) Nrf2 enhances resistance of cancer cells to chemotherapeutic drugs, the dark side of Nrf2. *Carcinogenesis* 29(6):1235–1243. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgn095>
54. Chen N, Wu L, Yuan H, Wang J (2015) ROS/autophagy/Nrf2 pathway mediated low-dose radiation induced radio-resistance in human lung adenocarcinoma A549 cell. *Int J Biol Sci* 11(7):833–844. <https://doi.org/10.7150/ijbs.10564>
55. Bryan HK, Olayanju A, Goldring CE, Park BK (2013) The Nrf2 cell defence pathway: Keap1-dependent and -independent mechanisms of regulation. *Biochem Pharmacol* 85(6):705–717. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.11.016>
56. Ayers D, Baron B, Hunter T (2015) miRNA influences in NRF2 pathway interactions within cancer models. *J Nucleic Acids* 2015:143636. <https://doi.org/10.1155/2015/143636>
57. Wagner AE, Boesch-Saadatmandi C, Dose J, Schultheiss G, Rimbach G (2012) Anti-inflammatory potential of allyl-isothiocyanate—role of Nrf2, NF-(kappa) B and microRNA-155. *J Cell Mol Med* 16(4):836–843. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01367.x>
58. Miao W, Hu L, Scrivens PJ, Batist G (2005) Transcriptional regulation of NF-E2 p45-related factor (NRF2) expression by the aryl hydrocarbon receptor-xenobiotic response element signaling pathway: direct cross-talk between phase I and II drug-metabolizing enzymes. *J Biol Chem* 280(21):20340–20348. <https://doi.org/10.1074/jbc.M412081200>
59. Joo MS, Lee CG, Koo JH, Kim SG (2013) miR-125b transcriptionally increased by Nrf2 inhibits AhR repressor, which protects kidney from cisplatin-induced injury. *Cell Death Dis* 4:e899. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.427>
60. Hayden MS, Ghosh S (2011) NF-kappaB in immunobiology. *Cell Res* 21(2):223–244. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.13>
61. Prasad AV, Mohan N, Chandrasekar B, Meltz ML (1994) Activation of nuclear factor kappa B in human lymphoblastoid cells by low-dose ionizing radiation. *Radiat Res* 138(3):367–372
62. Rodel F, Hantschel M, Hildebrandt G, Schultze-Mosgau S, Rodel C, Herrmann M, Sauer R, Voll RE (2004) Dose-dependent biphasic induction and transcriptional activity of nuclear factor kappa B (NF-kappaB) in EA.hy.926 endothelial cells after low-dose X-irradiation. *Int J Radiat Biol* 80(2):115–123. <https://doi.org/10.1080/09553000310001654701>
63. Rodel F, Frey B, Capalbo G, Gaipal U, Keilholz L, Voll R, Hildebrandt G, Rodel C (2010) Discontinuous induction of X-linked inhibitor of apoptosis in EA.hy.926 endothelial cells is linked to NF-kappaB activation and mediates the anti-inflammatory properties of low-dose ionising-radiation. *Radiother Oncol* 97(2):346–351. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2010.01.013>
64. Lodermann B, Wunderlich R, Frey S, Schorn C, Stangl S, Rodel F, Keilholz L, Fietkau R, Gaipal US, Frey B (2012) Low dose ionising radiation leads to a NF-kappaB dependent decreased secretion of active IL-1beta by activated macrophages with a discontinuous dose-dependency. *Int J Radiat Biol* 88(10):727–734. <https://doi.org/10.3109/09553002.2012.689464>
65. Kim CS, Kim JK, Nam SY, Yang KH, Jeong M, Kim HS, Jin YW, Kim J (2007) Low-dose radiation stimulates the proliferation of normal human lung fibroblasts via a transient activation of Raf and Akt. *Mol Cells* 24(3):424–430
66. Murley JS, Kataoka Y, Weydert CJ, Oberley LW, Grdina DJ (2006) Delayed radioprotection by nuclear transcription factor kappaB-mediated induction of manganese superoxide dismutase in human microvascular endothelial cells after exposure to the free radical scavenger WR1065. *Free Radic Biol Med* 40(6):1004–1016. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.10.060>
67. Park HS, Seong KM, Kim JY, Kim CS, Yang KH, Jin YW, Nam SY (2013) Chronic low-dose radiation inhibits the cells death by cytotoxic high-dose radiation increasing the level of AKT and acinus proteins via NF-kappaB activation. *Int J Radiat Biol* 89(5):371–377. <https://doi.org/10.3109/09553002.2013.754560>
68. Murley JS, Baker KL, Miller RC, Darga TE, Weichselbaum RR, Grdina DJ (2011) SOD2-mediated adaptive responses induced by low-dose ionizing radiation via TNF signaling and amifostine. *Free Radic Biol Med* 51(10):1918–1925. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.08.032>
69. Lake D, Correa SA, Muller J (2016) Negative feedback regulation of the ERK1/2 MAPK pathway. *Cell Mol Life Sci* 73(23):4397–4413. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2297-8>
70. McKay MM, Morrison DK (2007) Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. *Oncogene* 26(22):3113–3121. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210394>
71. Dent P, Yacoub A, Fisher PB, Hagan MP, Grant S (2003) MAPK pathways in radiation responses. *Oncogene* 22(37):5885–5896. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206701>
72. Kim CS, Kim JM, Nam SY, Yang KH, Jeong M, Kim HS, Lim YK, Jin YW, Kim J (2007) Low-dose of ionizing radiation enhances cell proliferation via transient ERK1/2 and p38 activation in normal human lung fibroblasts. *J Radiat Res* 48(5):407–415

73. Park HS, You GE, Yang KH, Kim JY, An S, Song JY, Lee SJ, Lim YK, Nam SY (2015) Role of AKT and ERK pathways in controlling sensitivity to ionizing radiation and adaptive response induced by low-dose radiation in human immune cells. *Eur J Cell Biol* 94(12):653–660. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2015.08.003>
74. Yu H, Liu N, Wang H, Shang Q, Jiang P, Zhang Y (2013) Different responses of tumor and normal cells to low-dose radiation. *Contemp Oncol (Pozn)* 17(4):356–362. <https://doi.org/10.5114/wo.2013.35289>
75. Asur R, Balasubramaniam M, Marples B, Thomas RA, Tucker JD (2010) Involvement of MAPK proteins in bystander effects induced by chemicals and ionizing radiation. *Mutat Res* 686(1–2):15–29. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2009.12.007>
76. Jiang T, Harder B, Rojo de la Vega M, Wong PK, Chapman E, Zhang DD (2015) p62 links autophagy and Nrf2 signaling. *Free Radic Biol Med* 88(Pt B):199–204. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.014>
77. Cullinan SB, Zhang D, Hannink M, Arvaisis E, Kaufman RJ, Diehl JA (2003) Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival. *Mol Cell Biol* 23(20):7198–7209
78. Woo CW, Cui D, Arellano J, Dorweiler B, Harding H, Fitzgerald KA, Ron D, Tabas I (2009) Adaptive suppression of the ATF4-CHOP branch of the unfolded protein response by toll-like receptor signalling. *Nat Cell Biol* 11(12):1473–1480. <https://doi.org/10.1038/ncb1996>
79. Zinszner H, Kuroda M, Wang X, Batchvarova N, Lightfoot RT, Mottotti H, Stevens JL, Ron D (1998) CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev* 12(7):982–995
80. Li N, Hao M, Phalen RF, Hinds WC, Nel AE (2003) Particulate air pollutants and asthma. A paradigm for the role of oxidative stress in PM-induced adverse health effects. *Clin Immunol* 109(3):250–265
81. Kroemer G, Marino G, Levine B (2010) Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell* 40(2):280–293. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.023>
82. Zhang Q, Kang R, Zeh HJ 3rd, Lotze MT, Tang D (2013) DAMPs and autophagy: cellular adaptation to injury and unscheduled cell death. *Autophagy* 9(4):451–458. <https://doi.org/10.4161/auto.23691>
83. Scarlatti F, Granata R, Meijer AJ, Codogno P (2009) Does autophagy have a license to kill mammalian cells? *Cell Death Differ* 16(1):12–20. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.101>
84. Fougeray S, Pallet N (2015) Mechanisms and biological functions of autophagy in diseased and ageing kidneys. *Nat Rev Nephrol* 11(1):34–45. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2014.201>
85. Jiang M, Liu K, Luo J, Dong Z (2010) Autophagy is a renoprotective mechanism during in vitro hypoxia and in vivo ischemia-reperfusion injury. *Am J Pathol* 176(3):1181–1192. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090594>
86. Vion AC, Kheloufi M, Hammoutene A, Poisson J, Lasselin J, Devue C, Pic I, Dupont N, Busse J, Stark K, Lafaurie-Janvère J, Barakat AI, Loyer X, Souyri M, Viollet B, Julia P, Tedgui A, Codogno P, Boulanger CM, Rautou PE (2017) Autophagy is required for endothelial cell alignment and atheroprotection under physiological blood flow. *Proc Natl Acad Sci USA* 114(41):E8675–E8684. <https://doi.org/10.1073/pnas.1702223114>
87. Paglin S, Hollister T, Delohery T, Hackett N, McMahill M, Sphicas E, Domingo D, Yahalom J (2001) A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles. *Cancer Res* 61(2):439–444
88. Paglin S, Lee NY, Nakar C, Fitzgerald M, Plotkin J, Deuel B, Hackett N, McMahill M, Sphicas E, Lampen N, Yahalom J (2005) Rapamycin-sensitive pathway regulates mitochondrial membrane potential, autophagy, and survival in irradiated MCF-7 cells. *Cancer Res* 65(23):11061–11070. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1083>
89. Paglin S, Yahalom J (2006) Pathways that regulate autophagy and their role in mediating tumor response to treatment. *Autophagy* 2(4):291–293
90. Zois CE, Koukourakis MI (2009) Radiation-induced autophagy in normal and cancer cells: towards novel cytoprotection and radio-sensitization policies? *Autophagy* 5(4):442–450
91. Kim H, Bernard ME, Flickinger J, Epperly MW, Wang H, Dixon TM, Shields D, Houghton F, Zhang X, Greenberger JS (2011) The autophagy-inducing drug carbamazepine is a radiation protector and mitigator. *Int J Radiat Biol* 87(10):1052–1060. <https://doi.org/10.3109/09553002.2011.587860>
92. Chargui A, Zekri S, Jacquillet G, Rubera I, Ilie M, Belaid A, Duranton C, Tauc M, Hofman P, Poujeol P, El May MV, Mograbi B (2011) Cadmium-induced autophagy in rat kidney: an early biomarker of subtoxic exposure. *Toxicol Sci* 121(1):31–42. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr031>
93. Clevers H, Nusse R (2012) Wnt/beta-catenin signaling and disease. *Cell* 149(6):1192–1205. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.012>
94. van Amerongen R, Nusse R (2009) Towards an integrated view of Wnt signaling in development. *Development* 136(19):3205–3214. <https://doi.org/10.1242/dev.033910>
95. Staal FJ, Luis TC, Tiemessen MM (2008) WNT signalling in the immune system: WNT is spreading its wings. *Nat Rev Immunol* 8(8):581–593. <https://doi.org/10.1038/nri2360>
96. Zhang RF, Wang Q, Zhang AA, Xu JG, Zhai LD, Yang XM, Liu XT (2018) Low-level laser irradiation promotes the differentiation of bone marrow stromal cells into osteoblasts through the APN/Wnt/beta-catenin pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 22(9):2860–2868. [https://doi.org/10.26355/eurrev\\_201805\\_14988](https://doi.org/10.26355/eurrev_201805_14988)
97. Alexandrou AT, Li JJ (2014) Cell cycle regulators guide mitochondrial activity in radiation-induced adaptive response. *Antioxid Redox Signal* 20(9):1463–1480. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5684>
98. Maes OC, An J, Sarojini H, Wu H, Wang E (2008) Changes in MicroRNA expression patterns in human fibroblasts after low-LET radiation. *J Cell Biochem* 105(3):824–834. <https://doi.org/10.1002/jcb.21878>
99. Kern P, Keilholz L, Forster C, Seegenschmiedt MH, Sauer R, Herrmann M (1999) In vitro apoptosis in peripheral blood mononuclear cells induced by low-dose radiotherapy displays a discontinuous dose-dependence. *Int J Radiat Biol* 75(8):995–1003
100. Kern PM, Keilholz L, Forster C, Stach C, Beyer TD, Gaipf US, Kalden JR, Hallmann R, Herrmann M (2000) UVB-irradiated T-cells undergoing apoptosis lose L-selectin by metalloprotease-mediated shedding. *Int J Radiat Biol* 76(9):1265–1271
101. Gaipf US, Meister S, Lodermann B, Rodel F, Fietkau R, Herrmann M, Kern PM, Frey B (2009) Activation-induced cell death and total Akt content of granulocytes show a biphasic course after low-dose radiation. *Autoimmunity* 42(4):340–342
102. Candas D, Fan M, Nantajit D, Vaughan AT, Murley JS, Woloschak GE, Grdina DJ, Li JJ (2013) CyclinB1/Cdk1 phosphorylates mitochondrial antioxidant MnSOD in cell adaptive response to radiation stress. *J Mol Cell Biol* 5(3):166–175. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjs062>
103. Amundson SA, Lee RA, Koch-Paiz CA, Bittner ML, Meltzer P, Trent JM, Fornace AJ Jr (2003) Differential responses of stress genes to low dose-rate gamma irradiation. *Mol Cancer Res* 1(6):445–452
104. Azimian H, Bahreyni-Toossi MT, Rezaei AR, Rafatpanah H, Hamzehloei T, Fardid R (2015) Up-regulation of Bcl-2 expression in cultured human lymphocytes after exposure to low

- doses of gamma radiation. *J Med Phys* 40(1):38–44. <https://doi.org/10.4103/0971-6203.152249>
105. Wei LC, Ding YX, Liu YH, Duan L, Bai Y, Shi M, Chen LW (2012) Low-dose radiation stimulates Wnt/beta-catenin signaling, neural stem cell proliferation and neurogenesis of the mouse hippocampus in vitro and in vivo. *Curr Alzheimer Res* 9(3):278–289
  106. Zhao L, Ackerman SL (2006) Endoplasmic reticulum stress in health and disease. *Curr Opin Cell Biol* 18(4):444–452. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2006.06.005>
  107. Pallet N, Fougeray S, Beaune P, Legendre C, Thervet E, Anglicheau D (2009) Endoplasmic reticulum stress: an unrecognized actor in solid organ transplantation. *Transplantation* 88(5):605–613. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3181b22cec>
  108. Kaufman RJ (2002) Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *J Clin Invest* 110(10):1389–1398. <https://doi.org/10.1172/JCI16886>
  109. Kitamura M (2008) Endoplasmic reticulum stress in the kidney. *Clin Exp Nephrol* 12(5):317–325. <https://doi.org/10.1007/s10157-008-0060-7>
  110. La Rovere RM, Roest G, Bultynck G, Parys JB (2016) Intracellular Ca(2+) signaling and Ca(2+) microdomains in the control of cell survival, apoptosis and autophagy. *Cell Calcium* 60(2):74–87. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2016.04.005>
  111. Shinkai Y, Kaji T (2012) Cellular defense mechanisms against lead toxicity in the vascular system. *Biol Pharm Bull* 35(11):1885–1891
  112. Peyrou M, Cribb AE (2007) Effect of endoplasmic reticulum stress preconditioning on cytotoxicity of clinically relevant nephrotoxins in renal cell lines. *Toxicol In Vitro* 21(5):878–886. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2007.03.001>
  113. Qian Y, Falahatpisheh MH, Zheng Y, Ramos KS, Tiffany-Castiglioni E (2001) Induction of 78 kD glucose-regulated protein (GRP78) expression and redox-regulated transcription factor activity by lead and mercury in C6 rat glioma cells. *Neurotox Res* 3(6):581–589
  114. Chandrika BB, Yang C, Ou Y, Feng X, Muhoza D, Holmes AF, Theus S, Deshmukh S, Haun RS, Kaushal GP (2015) Endoplasmic reticulum stress-induced autophagy provides cytoprotection from chemical hypoxia and oxidant injury and ameliorates renal ischemia-reperfusion injury. *PLoS One* 10(10):e0140025. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140025>
  115. Qian Y, Harris ED, Zheng Y, Tiffany-Castiglioni E (2000) Lead targets GRP78, a molecular chaperone, in C6 rat glioma cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 163(3):260–266. <https://doi.org/10.1006/taap.1999.8878>
  116. Nagasawa H, Little JB (1992) Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of alpha-particles. *Cancer Res* 52(22):6394–6396
  117. Hamada N, Matsumoto H, Hara T, Kobayashi Y (2007) Inter-cellular and intracellular signaling pathways mediating ionizing radiation-induced bystander effects. *J Radiat Res* 48(2):87–95
  118. Mothersill C, Seymour C (2004) Radiation-induced bystander effects and adaptive responses—the Yin and Yang of low dose radiobiology? *Mutat Res* 568(1):121–128. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.06.050>
  119. Iyer R, Lehnert BE (2002) Low dose, low-LET ionizing radiation-induced radioadaptation and associated early responses in unirradiated cells. *Mutat Res* 503(1–2):1–9
  120. Nobler MP (1969) The abscopal effect in malignant lymphoma and its relationship to lymphocyte circulation. *Radiology* 93(2):410–412. <https://doi.org/10.1148/93.2.410>
  121. Xue LY, Butler NJ, Makrigrigors GM, Adelstein SJ, Kassis AI (2002) Bystander effect produced by radiolabeled tumor cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(21):13765–13770. <https://doi.org/10.1073/pnas.182209699>
  122. Kassis AI (2004) In vivo validation of the bystander effect. *Hum Exp Toxicol* 23(2):71–73
  123. Morgan WF (2003) Non-targeted and delayed effects of exposure to ionizing radiation: II. Radiation-induced genomic instability and bystander effects in vivo, clastogenic factors and transgenerational effects. *Radiat Res* 159(5):581–596
  124. Azzam EI, de Toledo SM, Gooding T, Little JB (1998) Inter-cellular communication is involved in the bystander regulation of gene expression in human cells exposed to very low fluences of alpha particles. *Radiat Res* 150(5):497–504
  125. Azzam EI, de Toledo SM, Little JB (2001) Direct evidence for the participation of gap junction-mediated intercellular communication in the transmission of damage signals from alpha-particle irradiated to nonirradiated cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(2):473–478. <https://doi.org/10.1073/pnas.011417098>
  126. Iyer R, Lehnert BE, Svensson R (2000) Factors underlying the cell growth-related bystander responses to alpha particles. *Cancer Res* 60(5):1290–1298
  127. Mothersill C, Seymour CB (1998) Cell-cell contact during gamma irradiation is not required to induce a bystander effect in normal human keratinocytes: evidence for release during irradiation of a signal controlling survival into the medium. *Radiat Res* 149(3):256–262
  128. Portess DI, Bauer G, Hill MA, O'Neill P (2007) Low-dose irradiation of nontransformed cells stimulates the selective removal of precancerous cells via intercellular induction of apoptosis. *Cancer Res* 67(3):1246–1253. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2985>
  129. Han W, Zhu L, Jiang E, Wang J, Chen S, Bao L, Zhao Y, Xu A, Yu Z, Wu L (2007) Elevated sodium chloride concentrations enhance the bystander effects induced by low dose alpha-particle irradiation. *Mutat Res* 624(1–2):124–131. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2007.04.010>
  130. Ma S, Liu X, Jiao B, Yang Y (2010) Low-dose radiation-induced responses: focusing on epigenetic regulation. *Int J Radiat Biol* 86(7):517–528. <https://doi.org/10.3109/09553001003734592>
  131. Raiche J, Rodriguez-Juarez R, Pogribny I, Kovalchuk O (2004) Sex- and tissue-specific expression of maintenance and de novo DNA methyltransferases upon low dose X-irradiation in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 325(1):39–47. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.10.002>
  132. Pogribny I, Raiche J, Slovack M, Kovalchuk O (2004) Dose-dependence, sex- and tissue-specificity, and persistence of radiation-induced genomic DNA methylation changes. *Biochem Biophys Res Commun* 320(4):1253–1261. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.06.081>
  133. Dickey JS, Zemp FJ, Martin OA, Kovalchuk O (2011) The role of miRNA in the direct and indirect effects of ionizing radiation. *Radiat Environ Biophys* 50(4):491–499. <https://doi.org/10.1007/s00411-011-0386-5>
  134. Xu S, Ding N, Pei H, Hu W, Wei W, Zhang X, Zhou G, Wang J (2014) MiR-21 is involved in radiation-induced bystander effects. *RNA Biol* 11(9):1161–1170. <https://doi.org/10.4161/rna.34380>
  135. Xu S, Wang J, Ding N, Hu W, Zhang X, Wang B, Hua J, Wei W, Zhu Q (2015) Exosome-mediated microRNA transfer plays a role in radiation-induced bystander effect. *RNA Biol* 12(12):1355–1363. <https://doi.org/10.1080/15476286.2015.1100795>
  136. Asur RS, Thomas RA, Tucker JD (2009) Chemical induction of the bystander effect in normal human lymphoblastoid cells. *Mutat Res* 676(1–2):11–16. <https://doi.org/10.1016/j.mrgen.2009.02.012>
  137. Alexandre J, Hu Y, Lu W, Pelicano H, Huang P (2007) Novel action of paclitaxel against cancer cells: bystander effect mediated by reactive oxygen species. *Cancer Res* 67(8):3512–3517. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3914>

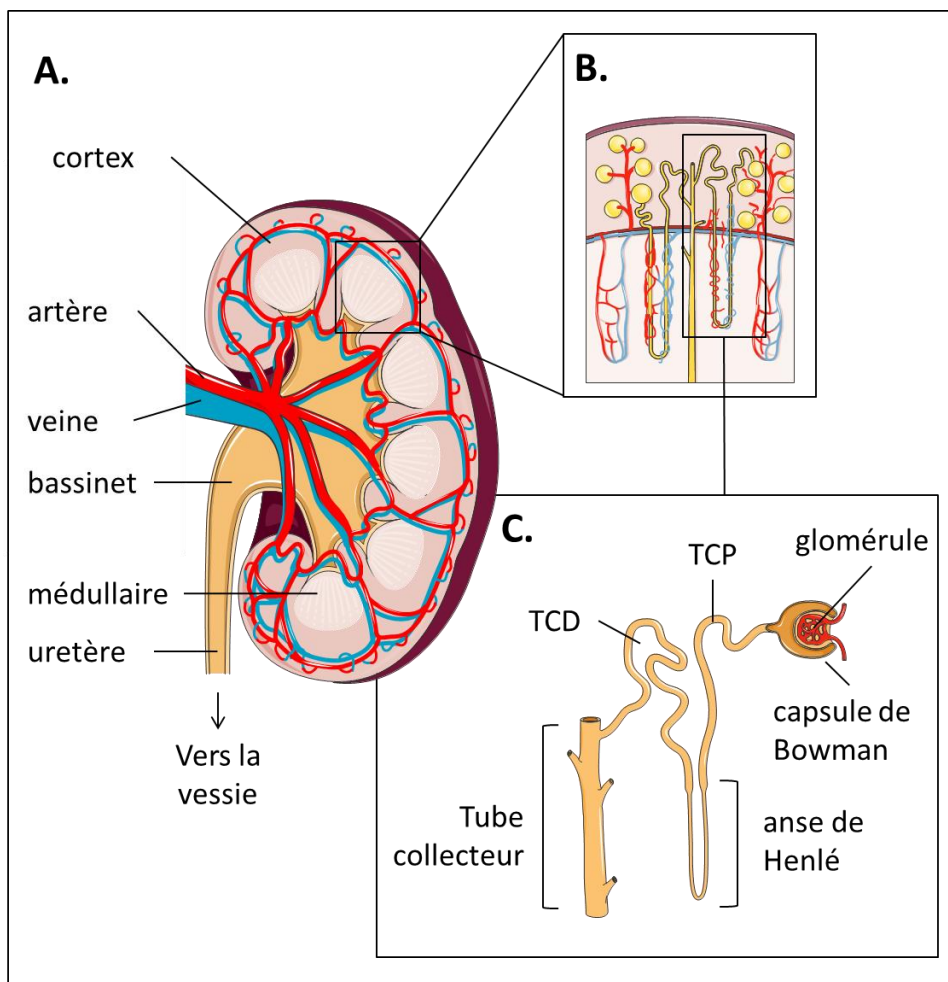
138. Demidem A, Morvan D, Madelmont JC (2006) Bystander effects are induced by CENU treatment and associated with altered protein secretory activity of treated tumor cells: a relay for chemotherapy? *Int J Cancer* 119(5):992–1004. <https://doi.org/10.1002/ijc.21761>
139. Rugo RE, Almeida KH, Hendricks CA, Jonnalagadda VS, Engelward BP (2005) A single acute exposure to a chemotherapeutic agent induces hyper-recombination in distantly descendant cells and in their neighbors. *Oncogene* 24(32):5016–5025. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208690>
140. Klaassen CD, Liu J (1998) Metallothionein transgenic and knock-out mouse models in the study of cadmium toxicity. *J Toxicol Sci* 23(Suppl 2):97–102
141. Myers JP, Zoeller RT, vom Saal FS (2009) A clash of old and new scientific concepts in toxicity, with important implications for public health. *Environ Health Perspect* 117(11):1652–1655. <https://doi.org/10.1289/ehp.0900887>
142. Nair AR, Lee WK, Smeets K, Swennen Q, Sanchez A, Thevenod F, Cuypers A (2015) Glutathione and mitochondria determine acute defense responses and adaptive processes in cadmium-induced oxidative stress and toxicity of the kidney. *Arch Toxicol* 89(12):2273–2289. <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1401-9>
143. Poisson C, Stefani J, Manens L, Delissen O, Suhard D, Tessier C, Dublineau I, Gueguen Y (2014) Chronic uranium exposure dose-dependently induces glutathione in rats without any nephrotoxicity. *Free Radic Res* 48(10):1218–1231. <https://doi.org/10.3109/10715762.2014.945441>
144. Gueguen Y, Rouas C, Monin A, Manens L, Stefani J, Delissen O, Grison S, Dublineau I (2014) Molecular, cellular, and tissue impact of depleted uranium on xenobiotic-metabolizing enzymes. *Arch Toxicol* 88(2):227–239. <https://doi.org/10.1007/s00204-013-1145-y>
145. Korashy HM, El-Kadi AO (2006) Transcriptional regulation of the NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 and glutathione S-transferase genes by mercury, lead, and copper. *Drug Metab Dispos* 34(1):152–165
146. Kataoka T (2013) Study of antioxidative effects and anti-inflammatory effects in mice due to low-dose X-irradiation or radon inhalation. *J Radiat Res* 54(4):587–596. <https://doi.org/10.1093/jrr/rrs141>
147. Kojima S, Nakayama K, Ishida H (2004) Low dose gamma-rays activate immune functions via induction of glutathione and delay tumor growth. *J Radiat Res* 45(1):33–39
148. Nomura T, Yamaoka K (1999) Low-dose gamma-ray irradiation reduces oxidative damage induced by CCl4 in mouse liver. *Free Radic Biol Med* 27(11–12):1324–1333
149. Bravard A, Luccioni C, Moustacchi E, Rigaud O (1999) Contribution of antioxidant enzymes to the adaptive response to ionizing radiation of human lymphoblasts. *Int J Radiat Biol* 75(5):639–645
150. Cui J, Yang G, Pan Z, Zhao Y, Liang X, Li W, Cai L (2017) Hormetic response to low-dose radiation: focus on the immune system and its clinical implications. *Int J Mol Sci* 18(2):280. <https://doi.org/10.3390/ijms18020280>
151. Rodel F, Frey B, Gaipl U, Keilholz L, Fournier C, Manda K, Schollnberger H, Hildebrandt G, Rodel C (2012) Modulation of inflammatory immune reactions by low-dose ionizing radiation: molecular mechanisms and clinical application. *Curr Med Chem* 19(12):1741–1750
152. Scott BR (2014) Radiation-hormesis phenotypes, the related mechanisms and implications for disease prevention and therapy. *J Cell Commun Signal* 8(4):341–352. <https://doi.org/10.1007/s12079-014-0250-x>
153. Ina Y, Sakai K (2005) Activation of immunological network by chronic low-dose-rate irradiation in wild-type mouse strains: analysis of immune cell populations and surface molecules. *Int J Radiat Biol* 81(10):721–729. <https://doi.org/10.1080/09553000500519808>
154. Luckey TD (1982) Physiological benefits from low levels of ionizing radiation. *Health Phys* 43(6):771–789
155. Bogdandi EN, Balogh A, Felgyinszki N, Szatmari T, Persa E, Hildebrandt G, Safrany G, Lumniczky K (2010) Effects of low-dose radiation on the immune system of mice after total-body irradiation. *Radiat Res* 174(4):480–489. <https://doi.org/10.1667/RR2160.1>
156. Klug F, Prakash H, Huber PE, Seibel T, Bender N, Halama N, Pfirsche C, Voss RH, Timke C, Umansky L, Klapproth K, Schakel K, Garbi N, Jager D, Weitz J, Schmitz-Winnenthal H, Hammerling GJ, Beckhove P (2013) Low-dose irradiation programs macrophage differentiation to an iNOS(+)/M1 phenotype that orchestrates effective T cell immunotherapy. *Cancer Cell* 24(5):589–602. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.09.014>
157. Wunderlich R, Ernst A, Rodel F, Fietkau R, Ott O, Lauber K, Frey B, Gaipl US (2015) Low and moderate doses of ionizing radiation up to 2 Gy modulate transmigration and chemotaxis of activated macrophages, provoke an anti-inflammatory cytokine milieu, but do not impact upon viability and phagocytic function. *Clin Exp Immunol* 179(1):50–61. <https://doi.org/10.1111/cei.12344>
158. Vieira Dias J, Gloaguen C, Kereselidze D, Manens L, Tack K, Ebrahimian TG (2018) Gamma low-dose-rate ionizing radiation stimulates adaptive functional and molecular response in human aortic endothelial cells in a threshold-, dose-, and dose rate-dependent manner. *Dose Response* 16(1):1559325818755238. <https://doi.org/10.1177/1559325818755238>
159. Budras KD, Hartung K, Munzer BM (1986) Light and electron microscopy studies of the effect of roentgen irradiation on the synovial membrane of the inflamed knee joint. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 99(5):148–152
160. Pandey R, Shankar BS, Sharma D, Sainis KB (2005) Low dose radiation induced immunomodulation: effect on macrophages and CD8+ T cells. *Int J Radiat Biol* 81(11):801–812. <https://doi.org/10.1080/09553000500531886>
161. Trott KR, Parker R, Seed MP (1995) The effect of x-rays on experimental arthritis in the rat. *Strahlenther Onkol* 171(9):534–538
162. Hildebrandt G, Radlingmayr A, Rosenthal S, Rothe R, Jahns J, Hindemith M, Rodel F, Kamprad F (2003) Low-dose radiotherapy (LD-RT) and the modulation of iNOS expression in adjuvant-induced arthritis in rats. *Int J Radiat Biol* 79(12):993–1001. <https://doi.org/10.1080/09553000310001636639>
163. Schae D, Jahns J, Hildebrandt G, Trott KR (2005) Radiation treatment of acute inflammation in mice. *Int J Radiat Biol* 81(9):657–667. <https://doi.org/10.1080/09553000500385556>
164. Nakatsukasa H, Tsukimoto M, Ohshima Y, Tago F, Masada A, Kojima S (2008) Suppressing effect of low-dose gamma-ray irradiation on collagen-induced arthritis. *J Radiat Res* 49(4):381–389
165. Zaiss MM, Frey B, Hess A, Zwerina J, Luther J, Nimmerjahn F, Engelke K, Kollias G, Hunig T, Schett G, David JP (2010) Regulatory T cells protect from local and systemic bone destruction in arthritis. *J Immunol* 184(12):7238–7246. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903841>
166. Frey B, Gaipl US, Sarter K, Zaiss MM, Stillkrieger W, Rodel F, Schett G, Herrmann M, Fietkau R, Keilholz L (2009) Whole body low dose irradiation improves the course of beginning polyarthritis in human TNF-transgenic mice. *Autoimmunity* 42(4):346–348
167. Aunapuu M, Pechter U, Gerskevits E, Marjamagi MM, Suuroja S, Arend A, Kolts I, Kuhnelt W, Ots M (2004) Low-dose radiation modifies the progression of chronic renal failure. *Ann Anat* 186(3):277–282. [https://doi.org/10.1016/S0940-9602\(04\)80017-7](https://doi.org/10.1016/S0940-9602(04)80017-7)

168. Pathak CM, Avti PK, Kumar S, Khanduja KL, Sharma SC (2007) Whole body exposure to low-dose gamma radiation promotes kidney antioxidant status in Balb/c mice. *J Radiat Res* 48(2):113–120
169. Ruiz S, Pergola PE, Zager RA, Vaziri ND (2013) Targeting the transcription factor Nrf2 to ameliorate oxidative stress and inflammation in chronic kidney disease. *Kidney Int* 83(6):1029–1041. <https://doi.org/10.1038/ki.2012.439>
170. Yoh K, Itoh K, Enomoto A, Hirayama A, Yamaguchi N, Kobayashi M, Morito N, Koyama A, Yamamoto M, Takahashi S (2001) Nrf2-deficient female mice develop lupus-like autoimmune nephritis. *Kidney Int* 60(4):1343–1353. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2001.00939.x>
171. Yoh K, Hirayama A, Ishizaki K, Yamada A, Takeuchi M, Yamagishi S, Morito N, Nakano T, Ojima M, Shimohata H, Itoh K, Takahashi S, Yamamoto M (2008) Hyperglycemia induces oxidative and nitrosative stress and increases renal functional impairment in Nrf2-deficient mice. *Genes Cells* 13(11):1159–1170. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2008.01234.x>
172. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK (2006) Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441(7090):235–238. <https://doi.org/10.1038/nature04753>
173. Farooque A, Mathur R, Verma A, Kaul V, Bhatt AN, Adhikari JS, Afrin F, Singh S, Dwarakanath BS (2011) Low-dose radiation therapy of cancer: role of immune enhancement. *Expert Rev Anticancer Ther* 11(5):791–802. <https://doi.org/10.1586/era.10.217>
174. Weng L, Williams RO, Vieira PL, Screaton G, Feldmann M, Dazzi F (2010) The therapeutic activity of low-dose irradiation on experimental arthritis depends on the induction of endogenous regulatory T cell activity. *Ann Rheum Dis* 69(8):1519–1526. <https://doi.org/10.1136/ard.2009.121111>
175. Ebrahimian T, Le Gallic C, Stefani J, Dublineau I, Yentrapalli R, Harms-Ringdahl M, Haghdoost S (2015) Chronic gamma-irradiation induces a dose-rate-dependent pro-inflammatory response and associated loss of function in human umbilical vein endothelial cells. *Radiat Res* 183(4):447–454. <https://doi.org/10.1667/RR13732.1>
176. Hoving S, Heeneman S, Gijbels MJ, te Poele JA, Russell NS, Daemen MJ, Stewart FA (2008) Single-dose and fractionated irradiation promote initiation and progression of atherosclerosis and induce an inflammatory plaque phenotype in ApoE(−/−) mice. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 71(3):848–857. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2008.02.031>
177. AGIR (2010) Report of the independent Advisory Group on Ionising Radiation—Circulatory Disease Risk. Documents of the Health Protection Agency. Radiation, Chemical and Environmental Hazards: Chilton, Doc HPA, RCE-16, 1–116
178. Le Gallic C, Phalente Y, Manens L, Dublineau I, Benderitter M, Gueguen Y, Lehoux S, Ebrahimian TG (2015) Chronic internal exposure to low dose <sup>137</sup>Cs induces positive impact on the stability of atherosclerotic plaques by reducing inflammation in ApoE<sup>−/−</sup> mice. *PLoS One* 10(6):e0128539. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128539>
179. Mitchel RE, Hasu M, Bugden M, Wyatt H, Little MP, Gola A, Hildebrandt G, Priest ND, Whitman SC (2011) Low-dose radiation exposure and atherosclerosis in ApoE(−)/(−) mice. *Radiat Res* 175(5):665–676. <https://doi.org/10.1667/RR2176.1>
180. Zhang C, Jin S, Guo W, Li C, Li X, Rane MJ, Wang G, Cai L (2011) Attenuation of diabetes-induced cardiac inflammation and pathological remodeling by low-dose radiation. *Radiat Res* 175(3):307–321. <https://doi.org/10.1667/RR1950.1>
181. Chen W, Xu X, Bai L, Padilla MT, Gott KM, Leng S, Tellez CS, Wilder JA, Belinsky SA, Scott BR, Lin Y (2012) Low-dose gamma-irradiation inhibits IL-6 secretion from human lung fibroblasts that promotes bronchial epithelial cell transformation by cigarette-smoke carcinogen. *Carcinogenesis* 33(7):1368–1374. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs159>
182. Bruce VR, Belinsky SA, Gott K, Liu Y, March T, Scott B, Wilder J (2012) Low-dose gamma-radiation inhibits benzo[a]pyrene-induced lung adenoma development in A/J mice. *Dose Response* 10(4):516–526. <https://doi.org/10.2203/dose-response.12-040.Bruce>
183. Calabrese EJ, Baldwin LA, Kostecky PT, Potter TL (1997) A toxicologically based weight-of-evidence methodology for the relative ranking of chemicals of endocrine disruption potential. *Regul Toxicol Pharmacol* 26(1 Pt 1):36–40. <https://doi.org/10.1006/rtph.1997.1115>
184. Miller MF, Goodson WH, Manjili MH, Kleinstreuer N, Bisson WH, Lowe L (2017) Low-dose mixture hypothesis of carcinogenesis workshop: scientific underpinnings and research recommendations. *Environ Health Perspect* 125(2):163–169. <https://doi.org/10.1289/EHP411>
185. Dimova EG, Bryant PE, Chankova SG (2008) Adaptive response: some underlying mechanisms and open questions. *Genet Mol Biol* 31:396–408









**Figure 4. Schéma d'une coupe longitudinale de rein et de son unité de filtration : le néphron**

On distingue les différentes zones du rein sur la coupe longitudinale (A), avec notamment la zone corticomédullaire (B) qui contient les néphrons, composés de glomérules et de réseaux tubulaires (C). TCP = tubule contourné proximal ; TCD = tubule contourné distal

## II. La néphrotoxicité de substances exogènes

### A. Le système rénal

L'appareil rénal a pour fonction de filtrer les résidus du sang, et de former l'urine, maintenant ainsi l'homéostasie de l'organisme. Le rein a plusieurs fonctions principales :

- l'élimination des produits de dégradation du métabolisme
- la détoxification de l'organisme par élimination de substances xénobiotiques
- la régulation des concentrations électrolytiques (sodium, potassium, calcium et phosphore)
- le contrôle de l'équilibre hydrique et de la pression osmotique
- le contrôle de l'équilibre acido-basique et du pH
- la régulation de la pression artérielle
- la formation d'hormones

#### 1. Anatomie

Les deux reins sont situés dans l'espace rétro-péritonéal de la région lombaire, de chaque côté de la colonne vertébrale, et ne sont pas recouverts de péritoine. Chez l'Homme un rein pèse environ 150 g et mesure en moyenne 12 cm de haut sur 6 cm de large. Les reins sont composés de trois zones spécifiques : le bassinet, la zone corticale qui est la zone externe, et la zone médullaire qui est située plus en profondeur du rein. Ces trois zones sont présentées sur le schéma **figure 4**.

Le bassinet est une cavité bordée de tissu rénal, qui s'étend depuis le bord concave du rein jusqu'à l'urètre. En forme d'entonnoir, c'est un réservoir collectant les urines en provenance de toutes les parties du rein, et qui les excrète depuis sa plus fine extrémité vers l'urètre. Enfin, les urines y seront acheminées vers la vessie avant d'être stockées, puis excrétées de l'organisme. Chaque jour, les reins filtrent environ 180 L de sang et produisent en moyenne 1.5 L d'urine définitive.

Dans la zone cortico-médullaire se trouvent les néphrons, qui sont les unités de filtration du rein, et qui sont composés d'un système tubulaire et du glomérule. En partant du glomérule, on trouve ensuite le tubule contourné proximal (TCP), puis l'anse de Henlé, avant d'arriver au tubule contourné distal (TCD) qui débouche sur le tube collecteur. Les TCP et TCD sont innervés par des terminaisons nerveuses sympathiques et peuvent donc être stimulés par le système nerveux autonome ou des médiateurs hormonaux tels que la vasopressine, une hormone antidiurétique.

La macula densa fait partie de l'appareil juxtaglomérulaire rénale et est le site de production de la rénine, un médiateur de la pression artérielle sécrété en réponse aux variations de pressions osmotiques et artérielles. La rénine permet la production de l'angiotensine, un agent hypertenseur.

#### 2. Fonctions physiologiques

Dans le rein, le sang arrive depuis les branches artérielles et leurs subdivisions dans la zone corticale et dans la zone médullaire. Chaque artériole arrive alors à une unité de filtration, le néphron. Chaque rein contient environ 1.2 millions de néphrons qui sont répartis entre le cortex et la médulla. La fonction principale des néphrons est de contribuer à l'homéostasie de l'organisme. Les glomérules possèdent des pôles vasculaires où arrivent les artérioles afférentes, et des pôles d'où sortent les artérioles efférentes, formant ainsi un réseau de capillaires péri-tubulaires. Ce réseau de vaisseaux

## Score RIFLE

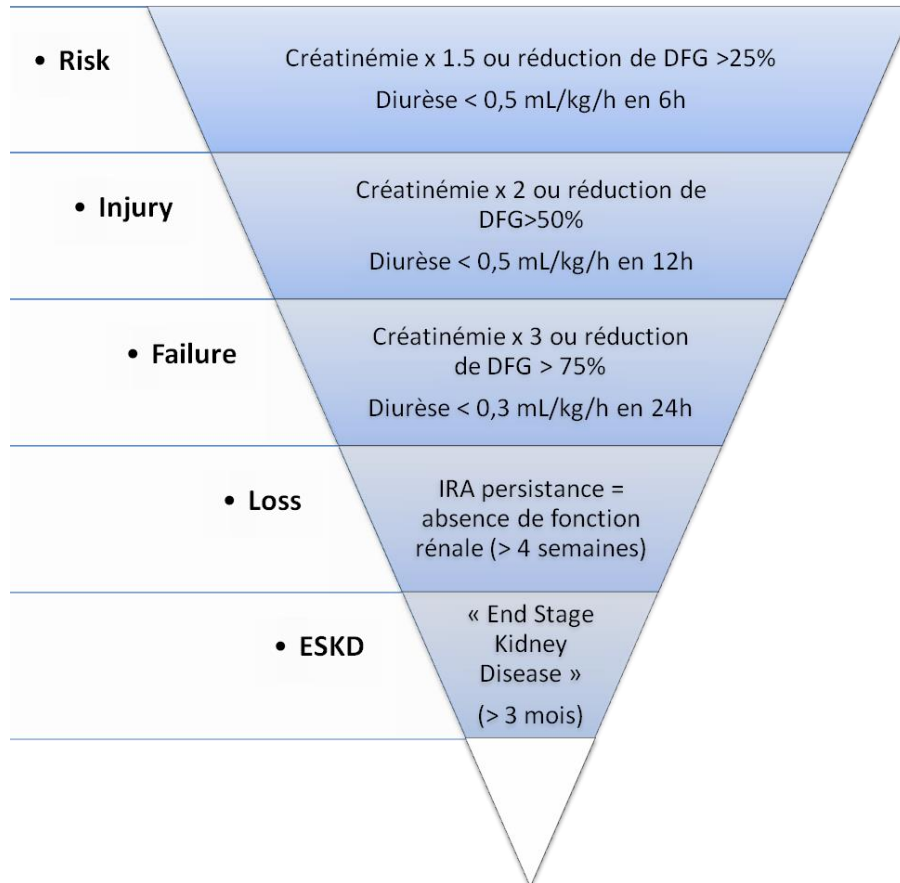


Figure 5 : Les classifications des atteintes rénales selon les critères RIFLE

Adaptée depuis Chhor et Journois 2006

vascularisant les glomérules et les tubules apporte au rein les résidus à filtrer, recycle les nutriments, les protéines et les électrolytes, tout en fournissant l'oxygène nécessaire au bon fonctionnement de l'organe. Le cortex reçoit environ 90% du flux sanguin, avec une proportion décroissante au fur et à mesure où l'on avance vers la zone médullaire.

La production d'urine primaire se fait au niveau glomérulaire, où le plasma provenant de la pelote capillaire est filtré dans la capsule de Bowman, puis distillé. La filtration du plasma est régulée par un équilibre entre pression osmotique et hydrostatique. Le filtrat glomérulaire est acheminé dans l'appareil tubulaire, passant tout d'abord par le TCP où s'attache l'anse de Henlé, puis vers la partie ascendante de l'anse où se trouve le TCD. Le filtrat finit alors dans le collecteur où se réunissent les autres tubules en provenance des autres néphrons. L'urine secondaire résulte du processus d'absorption et d'excrétion à travers les différentes structures tubulaires et atteint le bassinet, où elle va être acheminée vers l'urètre puis la vessie où elle sera finalement excrétée.

Environ 99% de l'eau et des nutriments essentiels qui sont filtrés (acides aminés, glucose) sont réabsorbés par les cellules tubulaires et passent dans les capillaires qui entourent le tube contourné proximal. Le sang non filtré est évacué au niveau des capillaires de la zone glomérulaire, puis par la veine rénale avant de retourner vers le cœur.

La filtration glomérulaire permet le passage de protéines d'un certain poids moléculaire, or, en cas de lésions de la membrane basale glomérulaire, des protéines de forts poids moléculaires (PM) telles que l'albumine se retrouvent dans les urines, indiquant ainsi une lésion glomérulaire ou tubulaire.

### **B. Les néphropathies**

Du fait de ses fonctions de filtration, de transport, de réabsorption et de métabolisation de substances chimiques, le rein est un des organes cibles principaux de la toxicité induite par les xénobiotiques. L'exposition à de telles substances peut engendrer des effets transitoires ou définitifs sur le rein, et une toxicité spécifiquement ciblée sur la zone glomérulaire, la zone tubulaire, ou encore le tissu interstitiel, pouvant ainsi engendrer des pathologies.

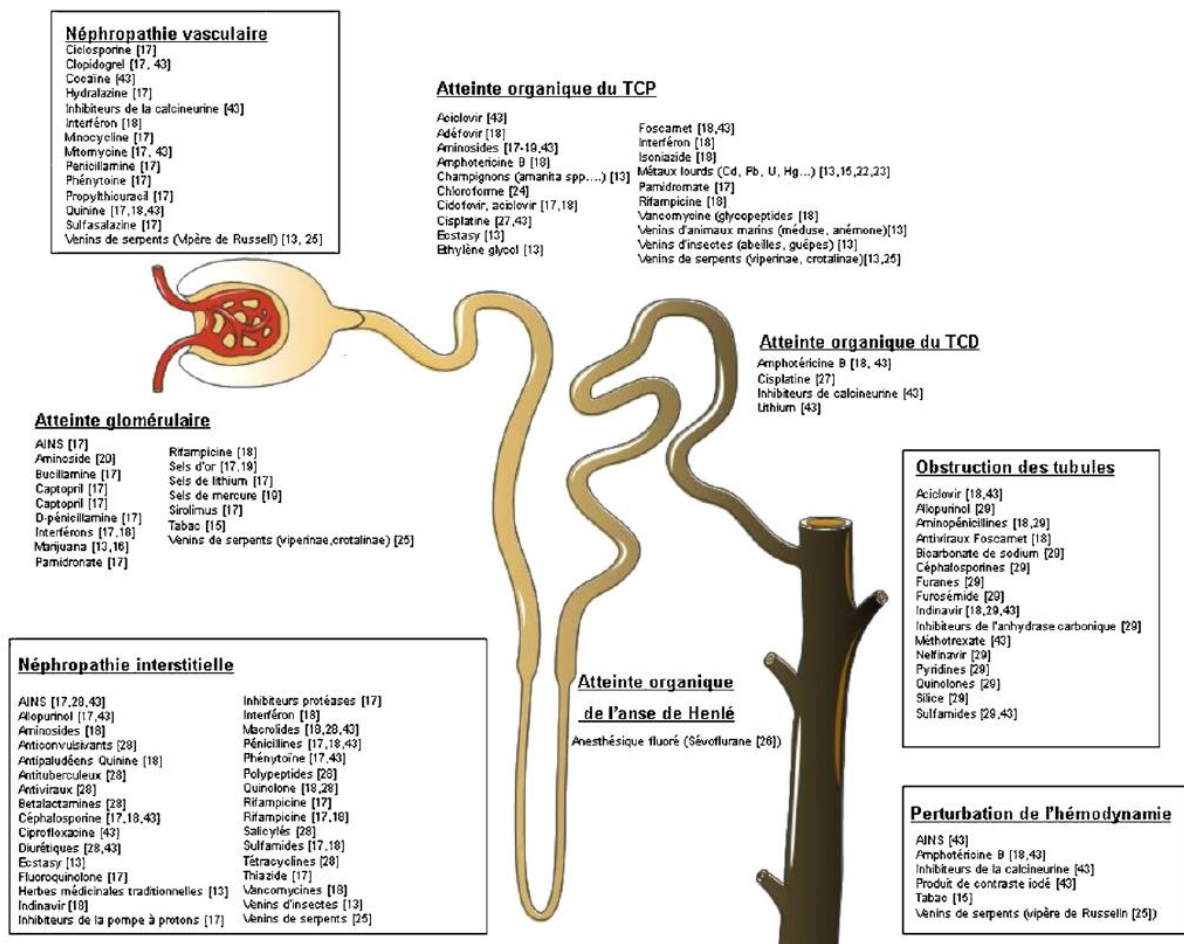
#### **1. Classement des atteintes rénales cliniques**

Globalement, une augmentation de l'incidence des IR est observée à l'échelle mondiale, avec en exemple une augmentation annuelle de 11% entre 1992 et 2001 (Cerdeira et al. 2008; Hilton 2006). Il existe deux catégories principales d'IR : l'insuffisance rénale aiguë (IRA), et l'insuffisance rénale chronique (IRC). Il est important de bien les différencier, car les symptômes et la prise en charge des patients diffèrent grandement.

Une IRA peut survenir après une diminution de la fonction de filtration glomérulaire, entraînant une urémie et des perturbations de l'équilibre acido-basique et de l'équilibre électrolytique. Ces effets rapides peuvent mettre en jeu le pronostic vital à court terme du patient. Afin de standardiser le diagnostic des IRA, il existe depuis 2004 une classification RIFLE (Risk, Injury, Failure, Loss of kidney function, End-stage kidney disease) qui se base sur une augmentation de la créatinine sérique, soit une réduction du débit de filtration glomérulaire (DFG) et/ou sur une diminution de la diurèse (Bellomo et al. 2004). Les critères de cette classification sont présentés en **figure 5**. En 2012, les recommandations KDIGO (Kidney Disease Improving Global Outcomes) ont fait évoluer la classification en graduations de 1 à 3, permettant ainsi d'améliorer les pertinences cliniques et

**Tableau 1 : les cinq stades d'IRC en fonction de leur DFG et de leur albuminurie**

Stade	Description	DFG (mL/min/1.73m <sup>3</sup> )	Albuminurie élevée
1	DFG normal ou augmenté	≥ 90	Oui
2	Limitée	60 à 89	Oui
3	Modérée	30 à 59	Oui / non
4	Sévère	15 à 29	Oui / non
5	Terminale	< 15	Oui / non



**Figure 6: Exemples de substances associées à des atteintes rénales : sites et mécanismes d'atteinte**

Source : Gueguen, Rouas *et al.* 2012

épidémiologiques et de mieux établir les liens entre la sévérité de l'IRA et les complications à court et long termes. Cette dernière mise à jour de la classification est encore d'actualité.

La persistance des symptômes d'une IRA peut mener à une IRC qui est accompagnée de symptômes de longue durée pouvant se traduire par une anémie monocyttaire et monochrome, une hyperphosphatémie, une hypercalcémie, voire une atrophie rénale chez l'Homme. Cette IRC se définit par la présence de lésions rénales, une diminution de la fonction rénale se traduisant par une diminution du taux de filtration glomérulaire et une augmentation de l'albuminurie pendant au moins 3 mois. Les mêmes critères surviendraient après une IRA, mais de manière plus soudaine, sur une durée de moins de trois mois (Johnson et al. 2004; Mehta et al. 2007). Les cinq stades de déficiences rénales chroniques sont indiqués dans le **tableau 1**, en fonction du DFG et de l'albuminurie qui y sont associés.

### *2. Les différents types de néphropathies*

La plupart des néphrotoxicités induites sont consécutives à des traitements médicamenteux ou à l'exposition à des substances xénobiotiques néphrotoxiques auxquelles l'Homme peut être exposé de manière journalière (Bacchetta et al. 2009; Bohatyrewicz et al. 2007; Cooper 2006; Werner et al. 1995). Il existe différents types de causes des néphropathies : les causes pré-rénales liées à une réduction du débit cardiaque, les causes rénales, et les causes post-rénales durant lesquelles survient une obstruction du tractus urinaire. La **figure 6** illustre la variabilité des substances néphrotoxiques ainsi que leur(s) cible(s) dans le système rénal (Gueguen et al. 2012).

#### *a. Les néphropathies avec des causes pré-rénales*

Il existe deux types d'atteintes rénales causées par des dérégulations pré-rénales : les atteintes fonctionnelles, et les néphropathies vasculaires. Réunis, celles-ci représentent 25% des IRA.

L'IR fonctionnelle est due à une hypoperfusion du rein. La filtration glomérulaire s'autorégule par la modification des résistances artériolaires pré et post-glomérulaires à travers le système rénine-angiotensine. L'IR fonctionnelle peut donc être provoquée par une diminution du flux sanguin rénal induit par une dérégulation des signaux vasoconstricteurs et vasodilatateurs. Des substances telles que les anti-inflammatoires non stéroïdiens peuvent induire une IRA fonctionnelle par l'inhibition de la synthèse des prostaglandines, menant ainsi à une augmentation des forces vasoconstrictrices (John and Herzenberg 2009).

Les néphropathies vasculaires correspondent à des atteintes rénales induites par l'intermédiaire de lésions artérielles, et sont souvent caractérisées par une hypertension et une IR. Elles peuvent être la conséquence d'une toxicité directe sur les cellules endothéliales, de l'action pro-coagulante du xénobiotique, ou de la formation d'anticorps auto-immuns dirigés contre les cellules endothéliales (John and Herzenberg 2009; Karie et al. 2010).

#### *b. Les néphropathies avec causes rénales*

Ces atteintes représentent 65% des IRA et sont directement liées à l'interaction d'une substance avec une structure rénale (glomérulaire, tubulaire, interstitielle ou vasculaire). La néphrotoxicité associée à un xénobiotique est dose-dépendante et cumulative mais peut être réversible dans la plupart des



cas, après un arrêt de l'exposition au toxique. Il peut cependant y avoir des évolutions d'IRA vers une néphropathie chronique.

### *α. Les atteintes glomérulaires*

Le glomérule constitue le principal filtre du néphron et a pour but de filtrer le sang et d'éliminer dans les urines les substances non retenues par l'organisme. L'atteinte glomérulaire se traduit généralement par une protéinurie, une hématurie, la formation d'œdèmes ou encore l'apparition d'une hypertension artérielle. Ces glomérulopathies sont souvent dues à des processus immunoallergiques, et des xénobiotiques tels que le mercure, ou encore les sels d'or prescrits dans le cadre du traitement de la polyarthrite rhumatoïde peuvent induire des réponses auto-immunes (Bigazzi 1999).

### *β. Les atteintes des tubules contournés proximaux*

Les atteintes des TCP représentent à elles seules 50% des IRA. Du fait de sa position en aval du glomérule, le TCP est la première structure à être exposée aux xénobiotiques. De plus, il est le siège de la majorité des échanges sang/urine et de l'activité métabolique du rein, et de ce fait, il est défini comme la structure étant la plus sensible aux agents xénobiotiques néphrotoxiques. Environ 65 % de l'eau et des électrolytes sont réabsorbés dans les TCP, et c'est pourquoi une atteinte de ces structures se manifeste par un syndrome de Fanconi, c'est-à-dire des troubles hydroélectrolytiques. Certains agents, tels que les aminosides ou les agents antiviraux, vont induire une cytotoxicité directe sur les cellules du TCP, avec notamment des altérations mitochondriales, tandis que d'autres substances vont modifier le système vasculaire environnant et ainsi induire une toxicité indirecte sur les TCP.

### *γ. Les autres sites cibles des néphropathies avec cause rénale*

Certaines substances néphrotoxiques sont capables d'induire des dommages rénaux, notamment dans l'anse de Henlé, les TCD, ou encore dans l'interstitium qui constitue les espaces inter-tubulaires et permet le soutien des tissus et le transit du fluide tubulaire vers les capillaires.

L'anse de Henlé n'est pas un des sites cibles majeurs de la néphrotoxicité induite par les xénobiotiques, mais certains composés, tels que les ions fluorures, ont la capacité d'altérer le fonctionnement des pompes Na-K-ATPase de la branche ascendante de l'anse, provoquant ainsi une diminution du gradient osmotique cortico-papillaire, et entraînant une perte de concentration des urines (Cittanova et al. 2002). Très peu de xénobiotiques induisent une néphrotoxicité ciblée sur les TCD, néanmoins certaines substances comme le cisplatine peuvent pénétrer dans ces structures et y induire une inflammation, un stress oxydatif, ou encore de l'apoptose (Pabla and Dong 2008). Les néphropathies interstitielles surviennent généralement dans un contexte d'allergie systémique et peuvent avoir plusieurs origines : bactériennes, virales, ou médicamenteuses. De nombreux xénobiotiques peuvent induire ce genre d'atteinte, mais parmi les plus fréquents on retrouve notamment les bêtalactamines, les anti-inflammatoires non stéroïdiens et les diurétiques (Caillard and Moulin 2003).





### c. Les néphropathies avec causes post-rénales

Les néphropathies post-rénales sont des atteintes secondaires dues à une uropathie obstructive des tubules. Des xénobiotiques tels que les sulfamides ou certains antibiotiques sont peu solubles et peuvent précipiter ou former des agrégats (lithiase) dans les tubules, formant ainsi des obstacles anatomiques ou fonctionnels et entraînant une augmentation de la pression intraluminaire, des lésions tubulaires et de la fibrose interstitielle (Daudon and Jungers 2004).

### 3. Les marqueurs de néphrotoxicité

Une déficience rénale, qu'elle soit chronique ou aiguë, peut conduire à une dialyse, une transplantation, ou une mort prématurée. C'est pourquoi il est nécessaire d'établir l'étiologie de la dysfonction rénale et de suivre l'évolution de la maladie. Les marqueurs cliniques classiques consistent au calcul de la diurèse et de la clairance rénale chez les patients, mais ces marqueurs sont généralement détectables à un stade trop tardif de la maladie. C'est pourquoi l'utilisation de nouveaux biomarqueurs est nécessaire pour identifier le plus tôt possible les personnes ayant un risque élevé de développer une pathologie rénale aiguë ou chronique, et permettre ainsi un traitement efficace.

Il existe des biomarqueurs de néphrotoxicité propres aux différents segments rénaux qui peuvent être induits par certains toxiques qui s'accumulent ou s'attaquent de manière préférentielle à des sites spécifiques du rein. C'est grâce aux études toxicologiques et mécanistiques que des biomarqueurs capables d'évaluer le risque individuel de susceptibilité, d'exposition, d'effet et de maladie rénale ont pu être identifiés.

La mesure d'un biomarqueur reflète une interaction entre un système biologique et un agent environnemental, qu'il soit chimique, physique ou biologique (Abromson-Leeman et al. 1993; Griffin et al. 2019; Gueguen et al. 2012). On peut les retrouver dans le sang ou dans les sécrétions mais il existe aussi des biomarqueurs tissulaires, nécessitant une biopsie pour établir le diagnostic. Les biomarqueurs permettent de mesurer l'état d'avancement d'une IR et doivent idéalement présenter plusieurs caractéristiques (Bennett and Devarajan 2017) :

- une détection précoce pour une prise en charge rapide
- un diagnostic précis du type de lésion
- une détermination de l'étiologie de la lésion
- une localisation de la lésion
- une prédiction de la gravité afin d'établir un pronostic et des effets secondaires potentiels
- un suivi de la thérapie après avoir établi un diagnostic

Il existe différents types de biomarqueurs (Gueguen et al. 2012), tels que cités ci-dessous, dont l'association avec plusieurs paramètres va permettre d'établir un diagnostic.

#### a. Les biomarqueurs de haut poids moléculaire

Le glomérule est considéré comme le filtre du néphron. Il a pour but de filtrer le sang et d'éliminer dans les urines les substances non retenues par l'organisme telles que l'eau, le sodium, l'urée, le glucose et les petites protéines. En revanche, ce dernier empêche le passage des éléments cellulaires du sang tels que les leucocytes et les érythrocytes, et les macromolécules dont le poids moléculaire



(PM) est égal ou supérieur à 70 kDa, telle que l'albumine. En moyenne, la barrière de filtration glomérulaire est mise en contact avec environ 13 kg de protéines tous les jours, mais la perméabilité très réduite de cette barrière aux protéines de haut PM associée aux propriétés d'endocytose de l'épithélium tubulaire proximal qui réabsorbe, dégrade et recycle les protéines filtrées sont à l'origine du faible débit de protéinurie physiologique observé en comparaison au débit de protéines sériques arrivant au glomérule (Pallet et al. 2019).

L'albumine est la protéine la plus abondante retrouvée dans les urines. Tandis qu'un fort taux urinaire en albumine (>300 mg/g créatinine) traduit une lésion structurale ou fonctionnelle glomérulaire, une faible augmentation (<300 mg/g créatinine) peut résulter, soit d'une augmentation de la filtration glomérulaire, soit d'une diminution de la réabsorption tubulaire (de Jong and Curhan 2006; Russo et al. 2007). C'est pourquoi dans le cas d'une microalbuminurie, une mesure de l'excrétion d'autres protéines doit être faite. Si cette dernière est associée à une augmentation de protéines de faible PM, la protéinurie résulte alors d'une diminution de la réabsorption tubulaire. En revanche, si la sécrétion urinaire de l'albumine n'est associée à aucune autre excrétion protéique, ou si elle est associée à une augmentation d'une autre protéine de haut PM, la protéinurie résulte alors d'une lésion d'origine glomérulaire. L'albumine est un des marqueurs les plus précoces d'une glomérulopathie induite expérimentalement chez le rat (Furness and Harris 1994; Sasaki et al. 2011) et son taux urinaire serait notamment augmenté *via* une induction de son expression génique lors d'une IR (Ware et al. 2011).

D'autres protéines de haut PM, telles que la transferrine, l'immunoglobuline G, l'haptoglobine, ou encore la  $\alpha$ 2-macroglobuline ne peuvent pas passer à travers le glomérule lorsque celui-ci n'est pas lésé. Par conséquent, une augmentation de leur concentration urinaire décrit une atteinte glomérulaire.

### b. Les biomarqueurs de bas poids moléculaire

Lors de lésions tubulaires, il se produit une déficience de la réabsorption tubulaire, induisant ainsi une augmentation de l'excrétion urinaire de protéines de bas PM (<70 kDa). Cependant cette augmentation peut également être due à une atteinte glomérulaire qui ne jouerait plus sa fonction de filtre correctement et laisserait passer plus de composés vers les urines, saturant ainsi les cellules tubulaires et produisant une atteinte tubulaire secondaire.

Parmi ces protéines de bas PM, on trouve les protéines lipocalines,  $\alpha$ 1-microglobuline,  $\beta$ 2-microglobuline (B2MG), cystatine C (cys-C), et la protéine de transport du rétinol (RBP), dont les taux augmentent lors d'une atteinte glomérulaire ou d'une altération fonctionnelle des cellules du TCP. La B2MG est un marqueur précoce dans le cas de lésions tubulaires, et son augmentation dose dépendante a été observée dans le cas de traitement par des anesthésiques tels que le sevoflurane, même en l'absence de variation du taux de créatinine ou d'urée sérique (Waring and Moonie 2011). Après traitement à la gentamicine, la teneur urinaire en B2MG et en cys-C représente un excellent biomarqueur de la perte d'activité des cellules du TCP, avant même l'apparition de lésions histologiques (Sasaki et al. 2011). La concentration sérique en cys-C est inversement proportionnelle au DFG, et sa concentration peut augmenter jusqu'à 200 fois en cas de dysfonctionnement tubulaire. Enfin, la RBP est induite dès l'apparition d'une diminution mineure de la fonction tubulaire, faisant ainsi de cette protéine un marqueur très sensible et précoce de la dysfonction tubulaire (Herget-Rosenthal et al. 2004).



### c. Les protéines à activité enzymatique

L'enzymurie résulte de la libération d'enzymes dans les urines depuis les cellules tubulaires lésées ou de l'induction enzymatique provoquée lors d'un processus de réparation ou de régénération. Elle permet de mettre en évidence des dommages encore légers et réversibles, entre 12 heures à 4 jours plus tôt que les marqueurs classiques, ce qui fait d'elle un excellent biomarqueur des lésions tubulaires. Cependant, l'enzymurie peut également résulter de certaines pathologies glomérulaires chroniques et peut être affectée par d'autres substances dans les urines, notamment l'urée (Emeigh Hart 2005; Scherberich 1990).

Parmi ces enzymes, on trouve la N-acétyl- $\beta$ -glucosaminidase (NAG) qui est une enzyme lysosomale exprimée dans les cellules des TCP, et dont l'augmentation d'activité témoigne d'une altération de cette section du néphron (Chew et al. 1993; D'Amico and Bazzi 2003; Emeigh Hart 2005). Son augmentation urinaire a été observée suite à des traitements néphrotoxiques (Herget-Rosenthal et al. 2004; Westhuyzen et al. 2003), cependant elle peut également témoigner d'une pathologie glomérulaire, d'une néphropathie diabétique, ou même d'une arthrite rhumatoïde ou d'hyperparathyroïdie sans atteinte rénale (Ferguson et al. 2008).

Les glutathion-S-transférases (GST) sont des enzymes cytoplasmiques présentes dans les cellules du TCP ( $\alpha$ -GST) ou du TCD ( $\pi$ -GST) que l'on retrouve dans les urines de patients souffrant d'IRA (Westhuyzen et al. 2003).

### d. Les marqueurs inflammatoires

Une dysfonction rénale est généralement associée à un processus inflammatoire, et de ce fait certains biomarqueurs de l'IR sont des molécules inflammatoires. Par exemple, la lipocaline associée à la gélatinase des polynucléaires neutrophiles (NGAL) a un taux de sécrétion élevé (jusqu'à 30 fois), dès les deux premières heures suivant l'apparition d'une atteinte rénale induite par un médicament néphrotoxique (Mishra et al. 2004), ce qui fait d'elle un biomarqueur très prometteur. L'augmentation de cytokines peut également servir de biomarqueur de l'IRA. En effet des augmentations d'IL-1, IL-6, IL-8 et de TNF- $\alpha$  ont été associées à des dommages glomérulaires induits chez des patients souffrant d'IRA (Bagshaw et al. 2007), parfois en association avec une sécrétion de NGAL (Belcher et al. 2014; Edelstein 2017). Cependant, c'est la protéine pro-inflammatoire IL-18 qui représenterait un excellent biomarqueur de l'atteinte rénale aiguë, et plus spécifiquement d'une atteinte d'origine ischémique ou d'une nécrose tubulaire. Sa concentration urinaire augmente environ 6 heures après l'apparition de l'atteinte rénale et atteint son maximum 12 heures après, avec une induction jusqu'à 25 fois supérieure à sa concentration basale (Parikh and Devarajan 2008).

### e. Les marqueurs d'atteintes tubulaires

#### *$\alpha$ . Kidney injury molecule 1 (KIM-1)*

KIM-1 est une protéine transmembranaire surexprimée dans les cellules des TCP après une déficience rénale ou chronique induite par une ischémie ou une néphrotoxicité.

Cette molécule récemment découverte en tant que biomarqueur d'atteinte rénale, semble jouer plusieurs rôles dans la réponse cellulaire face au stress. Ichimura *et al.* ont supposé que KIM-1 jouait un rôle dans le processus de régénération rénale (Ichimura et al. 1998). En effet, les cellules

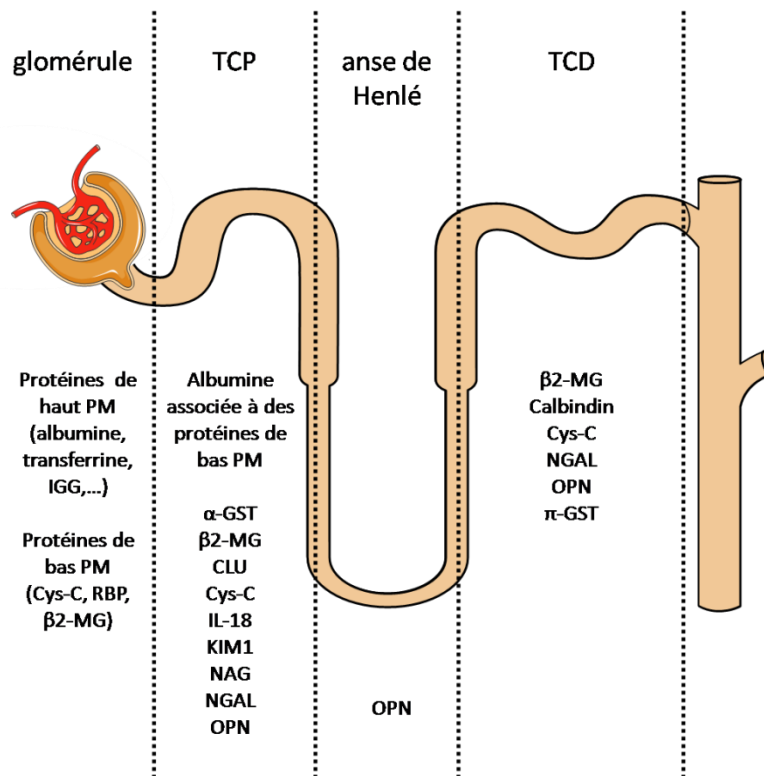


Figure 7: Exemples de biomarqueurs de néphrotoxicité exprimés dans différentes régions du néphron

épithéliales exprimant KIM-1 ont des propriétés phagocytaires, et il a été démontré que cette dernière joue un rôle dans la phagocytose des débris cellulaires apoptotiques de la lumière tubulaire, servant ainsi de mécanisme de protection contre la toxicité rénale aiguë (Brooks et al. 2015; Ichimura and Mou 2008). De plus, KIM-1 a été identifié comme un inhibiteur de l'immunité innée, induisant une diminution des cytokines pro-inflammatoires et une augmentation de la sécrétion de facteurs anti-inflammatoires dans le rein (Yang 2015).

Son expression tubulaire ainsi que son excrétion urinaire sont fortement corrélées à la déficience rénale induite chez l'Homme ou le rongeur après une exposition à divers agents néphrotoxiques telle que la gentamicine et à des métaux lourds, tel que le cadmium (Prozialeck et al. 2007; Rouas et al. 2011; Vaidya et al. 2009). Son taux augmente avant celui de la créatinine sérique, et cette augmentation précède également l'induction de GST ou de NAG après une exposition au cadmium (Prozialeck et al. 2009), faisant de KIM-1 un bon marqueur prédictif de l'atteinte rénale aiguë ou chronique. D'ailleurs, KIM-1 a été qualifié par la Food and Drug Administration et l'Agence Européenne des Médicaments comme étant un biomarqueur sensible et spécifique permettant de contrôler les atteintes rénales médicamenteuses dans les études précliniques ou cliniques (Vaidya et al. 2009).

### *β. Exemples d'autre biomarqueurs d'atteinte tubulaire*

La clusterine (CLU) et l'ostéopontine (OPN) sont deux glycoprotéines sécrétées dans les urines, témoignant d'atteintes tubulaires. La CLU serait un marqueur précoce et spécifique des atteintes rénales tubulaires du fait que son excrétion urinaire n'est pas induite après une atteinte glomérulaire dans différents modèles (Emeigh Hart 2005; Hidaka et al. 2002). La surexpression de l'OPN et son excrétion urinaire sont également induites dans plusieurs modèles animaux et humains d'atteintes rénales aiguës, en revanche son excrétion urinaire a également été observée dans le cas d'inflammation du rein induite par une glomérulonéphrite ou une néphrite tubulo-interstitielle (Trof et al. 2006; Verstrepen et al. 2001).

Les protéines liant le calcium (calbindine) peuvent également être des biomarqueurs d'atteinte rénale, mais plus spécifiquement lors d'une atteinte des TCD (Fuchs and Hewitt 2011). En effet, chez le rat, la localisation des protéines calbin-D9K et D28K a été mise en évidence spécifiquement dans les TCD et pas dans les TCP (Bindels et al. 1991).

### *f. Conclusion*

L'utilisation de ces biomarqueurs d'atteinte rénale permet donc d'améliorer les diagnostics, mais une association de plusieurs biomarqueurs peut s'avérer nécessaire du fait de la complexité des atteintes rénales et de la diversité de leur étiologie. Les divers biomarqueurs cités ci-dessus et leur localisation dans le rein sont représentés en **figure 7**.

Durant nos études expérimentales, nous avons privilégié l'utilisation des marqueurs CLU et KIM-1 car ce sont deux biomarqueurs très sensibles, et induits lors d'une atteinte des TCP, site principal de la néphrotoxicité de l'uranium et du fluor.





### III. L'uranium

#### A. Généralités

##### 1. Historique

C'est en 1789 que le chimiste allemand Martin Heinrich Klaproth découvrit le minerai d'uranium lors de la chauffe d'une roche de pechblende. Il proposa d'appeler ce nouveau composé « urane » ou « uranite », qui contenait principalement de l' $U_3O_8$ , un oxyde d'uranium qui avait la propriété de donner une couleur jaune verdâtre et qui servait alors à colorer les faïences et les céramiques.

L'uranium fut isolé pour la première fois en 1841 par le chimiste français Eugène-Melchior Péligot lorsque celui-ci réduisit le tétrachlorure d'uranium ( $UCl_4$ ) par le potassium, faisant ainsi entrer l'uranium dans la nomenclature de la chimie.

Le français Antoine Henri Becquerel découvrit en 1896 que les sels d'uranium extraits de pechblende étaient capables d'impressionner des plaques photographiques sans que celles-ci aient été exposées à la lumière. C'était la manifestation de radioactivité naturelle de l'uranium. Son étudiante, Marie Curie isolera d'autres éléments responsables de ce phénomène, dont le radium, avec son mari Pierre et lui donnera le nom de « radioactivité ».

La première fission nucléaire à partir d'atomes d'uranium est réalisée en Allemagne par Otto Hahn en 1939, à la veille de la seconde guerre mondiale. C'est alors que l'équipe du physicien italien Enrico Fermi construit le premier réacteur nucléaire à l'université de Chicago, dans un secret absolu. Ce réacteur que l'on nomme alors « pile atomique » produit la première réaction nucléaire contrôlée en 1942. Conscients du potentiel destructeur de l'arme atomique et effrayés à l'idée que l'Allemagne ne puisse se la procurer, les USA se lancent alors dans une course à l'armement contre l'Allemagne et donne naissance au projet Manhattan. Trois bombes atomiques sont alors créées : la première fut testée en Juillet 1945 sur le site de Trinity, au Nouveau-Mexique, tandis que les deux autres bombes furent lancées sur les villes japonaises d'Hiroshima et de Nagasaki.

Une fois la guerre terminée, les recherches se concentrent sur l'utilisation du nucléaire à des fins civiles. C'est en 1957 que la première centrale nucléaire américaine entre en activité, donnant suite à de nombreuses autres dans le monde entier.

##### 2. Propriétés physico-chimiques

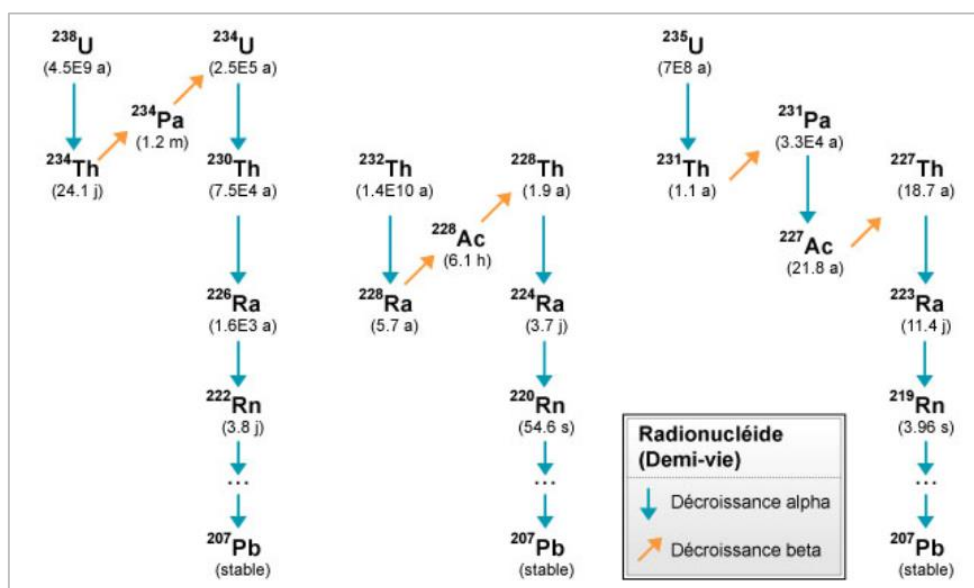
L'uranium, de symbole U, est le dernier élément naturel du tableau périodique de Mendeleïv. De la famille des actinides, cet élément possède 92 protons et 135 à 148 neutrons et est classé comme métal lourd, avec une densité de  $19.1 \text{ g/cm}^3$ , soit 70% plus dense que le plomb. L'uranium possède six électrons périphériques, et existe sous quatre valences possibles (III, IV, V ou VI), dont les valences IV et VI sont les plus répandues dans l'environnement. Le changement de valence se fait en fonction du pH et du potentiel d'oxydoréduction du milieu, qui est de 0,27 V dans l'eau. Les valences IV et VI, plus stables que les autres, permettent à l'uranium de former des complexes avec d'autres atomes tels que l'oxygène, l'azote ou le soufre. En solution aqueuse, l'uranium est principalement retrouvé sous la valence VI, et peut se complexer par l'intermédiaire de l'ion uranyle  $UO_2^{2+}$ .

**Tableau 2 : Les différentes unités de mesure de la radioactivité**

Mesure	Unité	Définition
Mesure de l'activité de la source radioactive	Becquerel (Bq)	Nombre de désintégrations par seconde dans la source
Mesure de dose	Gray (Gy)	Rapport d'énergie d'un objet sur sa masse (1 Gy = 1 joule/kg)
Mesure de dose efficace	Sievert (Sv)	Dose multipliée par un facteur de qualité (rayonnement dépendant) et par un facteur de pondération (tissu dépendant)

**Tableau 3 : Caractéristiques des principaux isotopes de l'uranium**

Isotope	Abondance naturelle (%)	Période radioactive (années)	Activité massique (Bq/g)	Emission principale par désintégration (keV)	Propriétés particulières
<sup>232</sup> U	-	70	8.2 x 10 <sup>11</sup>	α 5320 γ 57.8	-
<sup>234</sup> U	0.005	245 000	2.3 x 10 <sup>8</sup>	α 4775 γ 53.2	Isotope naturel le plus radioactif
<sup>235</sup> U	0.711	704 millions	8.0 x 10 <sup>4</sup>	α 4396 γ 53.2	Isotope naturel Noyau aisément fissible
<sup>236</sup> U	-	23.4 millions	2.4 x 10 <sup>6</sup>	α 4495 γ 49.4	-
<sup>238</sup> U	99.284	4.47 milliards	1.2 x 10 <sup>4</sup>	α 4198 γ 49.4	Isotope le plus abondant naturellement



**Figure 8: Chaîne de désintégration de l'uranium**

Source : Université Virtuelle Environnement et Développement durable

**Tableau 4 : Composition et activité des trois types d'uranium**

Type d'uranium	Composition isotopique			Activité spécifique (Bq/g)
	<sup>238</sup> U	<sup>235</sup> U	<sup>234</sup> U	
Uranium naturel	99.27 %	0.72 %	0.01 %	2.5 x 10 <sup>4</sup>
Uranium enrichi	95.74 %	4.25 %	0.01 %	4.2 x 10 <sup>4</sup>
Uranium appauvri	99.73 %	0.26 %	0.01 %	1.4 x 10 <sup>4</sup>

### 3. Propriétés radiologiques

Il existe trois types de grandeurs permettant de mesurer la radioactivité : la cadence des désintégrations, l'énergie radioactive absorbée et les effets biologiques. Chacune de ces méthodes de mesure possède une unité qui lui est propre indiquée dans le **tableau 2**.

L'uranium possède 26 isotopes, avec un nombre de masse allant de 227 à 242, mais dans son état naturel, l'uranium n'est composé que de trois isotopes :  $^{238}\text{U}$ ,  $^{235}\text{U}$  et  $^{234}\text{U}$ , qui sont tous radioactifs. Les caractéristiques des principaux isotopes de l'uranium sont présentées dans le **tableau 3**. Les isotopes  $^{238}\text{U}$  et  $^{235}\text{U}$  sont présents depuis l'origine de la Terre, tandis que l'isotope  $^{234}\text{U}$  est un produit de décroissance de  $^{238}\text{U}$ , comme on peut le voir dans la **figure 8**, montrant la chaîne de désintégration de  $^{235}\text{U}$  et  $^{238}\text{U}$ . Ces deux derniers isotopes sont à l'origine de la production de radon et de thorium, et mènent à la formation de noyaux de plomb stables.

L'uranium existe sous forme naturelle (UN), enrichie (UE), ou appauvrie (UA), avec des compositions isotopiques et des activités spécifiques détaillées en **tableau 4**. L'UE résulte de l'enrichissement en  $^{235}\text{U}$ , isotope fissile utilisé pour les réactions nucléaires dans les centrales ou pour la bombe atomique. L'uranium est un radionucléide émettant une raie gamma de faible intensité, mais il émet principalement des particules alpha. Ces particules ont un faible pouvoir pénétrant et c'est pourquoi le risque d'exposition externe à l'uranium reste mesuré. En effet, la couche épidermique de la peau suffit à arrêter ce type de rayonnements. En revanche, une contamination interne à l'uranium peut présenter des risques de toxicité chimique et radiologique dans les tissus et les cellules.

### 4. Origine et utilisations

L'uranium est le métal naturel le plus lourd retrouvé à ce jour, avec une concentration moyenne de 2 à 4 mg/kg dans la croûte terrestre (ATSDR 2013). Sa répartition est hétérogène en fonction des origines géologiques des terrains (Anke et al. 2009), tel que le montre sa répartition géologique en France (**figure 9**). Par conséquent, les concentrations d'uranium retrouvées dans les eaux naturelles dépendent de la proportion de roches uranifères présentent géographiquement (voir partie suivante sur les sources d'exposition). L'OMS estime la concentration moyenne en uranium dans les eaux de boisson à 0.4 µg/L, en fonction des régions (WHO 2012). Il existe cependant une forte disparité selon les régions et des taux d'uranium particulièrement élevés en comparaison à cette moyenne sont retrouvés en Finlande ou au Canada par exemple (voir partie 5. Sources d'expositions).

En dehors de sa présence naturelle, sa redistribution dans l'environnement dépend notamment des activités anthropogéniques liés à cet élément (Paulin 1997). L'uranium est principalement connu pour son rôle dans le cycle du combustible nucléaire, grâce à  $^{235}\text{U}$  qui a la propriété d'être fissile. En effet, pour qu'une réaction de fission nucléaire soit possible, l'uranium est enrichi en  $^{235}\text{U}$ , à hauteur de 4%. Les atomes de  $^{235}\text{U}$  sont cassés par un intense flux à neutrons, libérant ainsi une grande quantité d'énergie permettant d'activer des turbines à l'origine de la production d'électricité.

L'uranium est également utilisé à des fins militaires. Lorsqu'il est enrichi à hauteur de 90% en  $^{235}\text{U}$ , il est utilisé pour la fabrication de la bombe atomique. A l'inverse, l'uranium appauvri en  $^{235}\text{U}$  est un résidu de l'industrie nucléaire, sous-produit de l'enrichissement de l'uranium, qui est utilisé pour sa résistance et sa densité. Dans l'industrie de l'armement, il était utilisé pour les blindages de tanks ou les têtes d'obus, mais il était également utilisé à des fins civiles pour le lestage des ailes d'avion ou

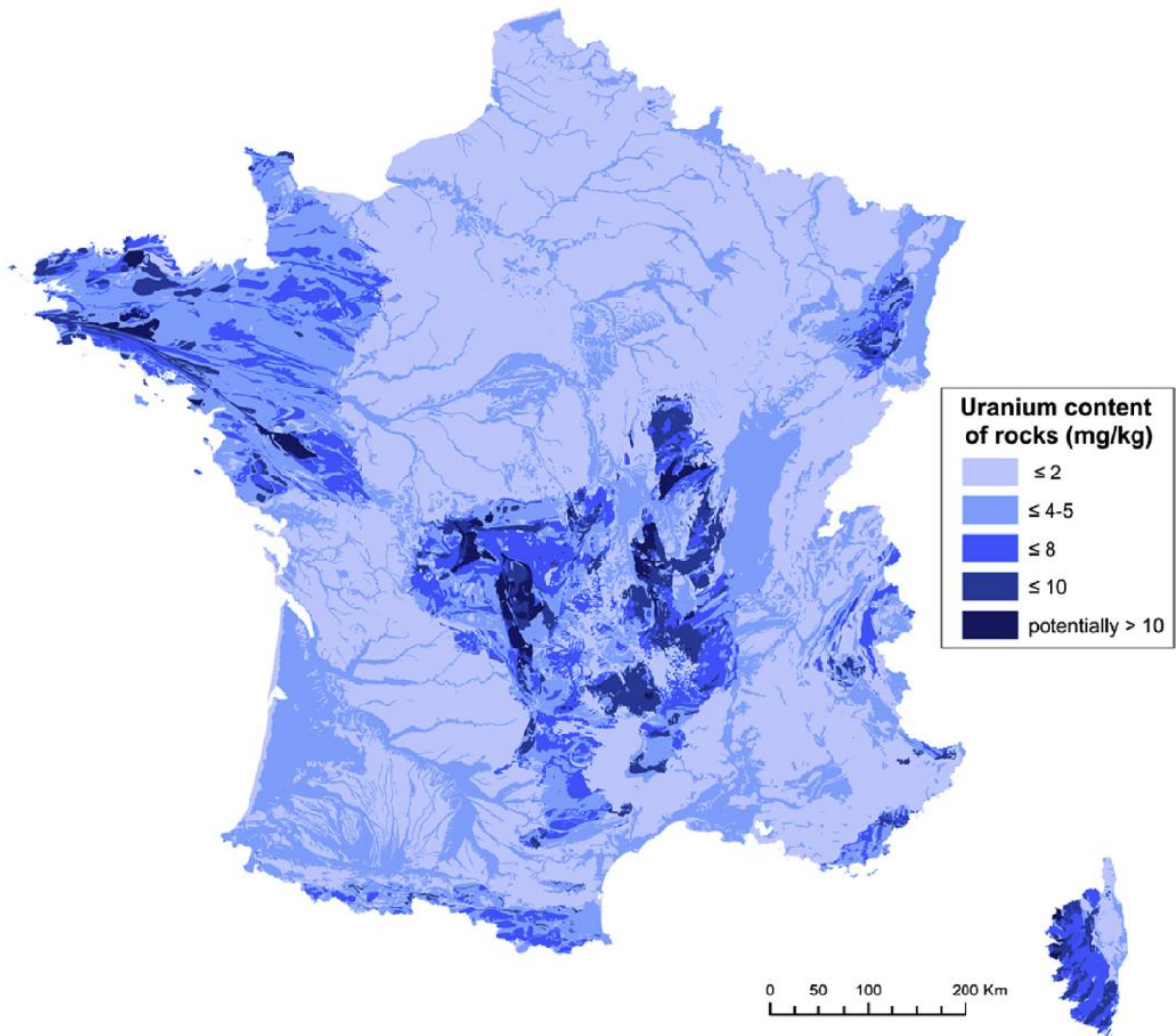


Figure 9 : Carte de la teneur moyenne en uranium des unités géologiques en France

Source : Ielsch *et al.* 2017

des quilles de bateaux, ou encore pour la fabrication de boucliers de protection utilisés en médecine nucléaire (Paquet et al. 2009). Le domaine agricole peut aussi engendrer un accroissement de la concentration en uranium dans l'environnement par l'utilisation d'engrais phosphatés, issus de phosphates naturels et particulièrement riches en UN.

### 5. Sources d'expositions

De par son origine naturelle et anthropogénique, l'uranium peut donc se retrouver dans l'eau de consommation et dans les aliments (Anke et al. 2009; Hakonson-Hayes et al. 2002), faisant ainsi de l'ingestion chronique la voie d'exposition majeure pour la population générale. L'OMS estime entre 1 et 4 µg la quantité moyenne d'uranium ingérée quotidiennement, tandis que la concentration moyenne en uranium des eaux de boissons est estimée à 0,4 µg/L. Sa valeur de recommandation maximale est de 30 µg/L (WHO 2012).

Étant donné l'hétérogénéité des concentrations d'uranium dans le sol, certaines régions possèdent des eaux naturellement plus concentrées en uranium, et par conséquent, certaines populations se retrouvent plus exposées. C'est notamment le cas dans le sud de la Finlande, où des puits privés ont été forés dans des roches uranifères, fournissant ainsi une eau de boisson fortement chargée en uranium, avec une concentration moyenne de 28 µg/L (Kurttio et al. 2002; Kurttio et al. 2005). Encore à ce jour, la plus haute concentration en uranium qui ait été retrouvée dans l'environnement provenait d'un puits privé finlandais dont les concentrations atteignaient les 20 mg/L (Juntunen 1991; Salonen 1994). D'autres pays dans le monde présentent également des taux élevés d'uranium dans les eaux, telles que certaines régions du Canada, où les concentrations ont atteint des valeurs supérieures à 700 µg/L d'uranium (Moss 1983, 1985), des États-Unis et du Mexique (Hakonson-Hayes et al. 2002), ou encore en Australie où des gisements sont exploités (Markich et al. 2002; WHO 2012). En France la valeur moyenne de la concentration en uranium dans l'eau de boisson est de 2,22 µg/L entre 2008 et 2009, variant entre 0,14 et 114 µg/L (AFSSA. 2010; ASN. et al. 2011).

De plus, les conflits internationaux (Guerre du Golfe, Kosovo,...) utilisant l'UA dans l'armement ont provoqué une contamination environnementale, augmentant ainsi les sources d'exposition pour les populations locales et les militaires présents sur place (Danesi et al. 2003; Di Lella et al. 2005; McDiarmid et al. 2007; Milacic and Simic 2009; Miller et al. 2004). L'utilisation de l'UA dans les munitions induit également un risque d'exposition transcutanée *via* des blessures (McDiarmid et al. 2007).

Les travailleurs du cycle nucléaire de l'uranium (mineurs, travailleurs dans les usines d'enrichissement, de production et de retraitement) peuvent également être exposés, en particulier par l'inhalation de poussières d'uranium ou par blessure cutanée (Ubios et al. 1997).

## B. Biocinétique dans l'organisme

### 1. Absorption

La toxicité de l'uranium augmente en fonction de la solubilité dans l'eau et de sa forme chimique (Karpas et al. 1998; Leggett and Harrison 1995; Wrenn et al. 1985). En effet, le nitrate d'uranyle, l'hexafluorure d'uranium et le tétrachlorure d'uranium ont une toxicité plus importante que des composés moins solubles tels que le tétrafluorure d'uranium, le diuranate de sodium ou encore le diuranate d'ammonium, tandis que les composants chimiques insolubles tels que le dioxyde et le



trioxide d'uranium ont une toxicité largement inférieure. Cette toxicité serait due notamment à la proportion d'uranium absorbée au niveau intestinale, qui est de 2% pour les composés solubles, contre 0,2% pour les composés non solubles (Konietzka 2015).

L'uranium possède trois voies d'entrée dans l'organisme : l'ingestion, l'inhalation, ou la blessure sous-cutanée (Craft et al. 2004). La principale voie d'exposition reste l'ingestion pour la majorité de la population, mais cependant de nombreuses études s'intéressent à la toxicité de l'uranium après inhalation ou blessure sous-cutanée pour étudier les effets potentiels d'expositions aiguës ou répétées sur les travailleurs du cycle du nucléaire et/ou sur les militaires.

### a. L'ingestion

L'ingestion d'uranium peut se faire directement par la consommation d'eau de boisson, ou indirectement par la consommation d'aliments contaminés, tels que la viande et les végétaux. Dans ce cas, l'uranium est absorbé au niveau de l'intestin grêle (Dublineau et al. 2005), à hauteur de 1 à 2 % chez l'Homme (Wrenn et al. 1985) et de 0,4 à 1 % chez le rongeur (Frelon et al. 2005; La Touche et al. 1987). Cependant, la fraction absorbée est dépendante de la solubilité de l'uranium puisque 2 % de la fraction soluble peut être absorbé, contre 0,2 % dans le cas des formes insolubles (ICRP 1995a; Konietzka 2015).

### b. L'inhalation

L'inhalation représente la voie principale d'exposition pour les travailleurs du cycle de l'uranium et les militaires. En effet, pendant l'extraction, l'enrichissement et le retraitement de l'uranium, de fines particules de poussières chargées d'uranium sont générées et peuvent passer à travers le système respiratoire. De la même manière, l'impact des munitions dans le cadre de conflits entre forces armées provoquent la formation de poussières chargées en uranium auxquelles peuvent être exposés les militaires. Une fois dans les poumons, les poussières d'uranium les plus fines peuvent passer dans la circulation sanguine *via* les alvéoles pulmonaires (ICRP 1995b), ou encore passer en suivant le réseau des nerfs olfactifs, pouvant alors aller jusqu'au cerveau (Ibanez et al. 2014; Tournier et al. 2009).

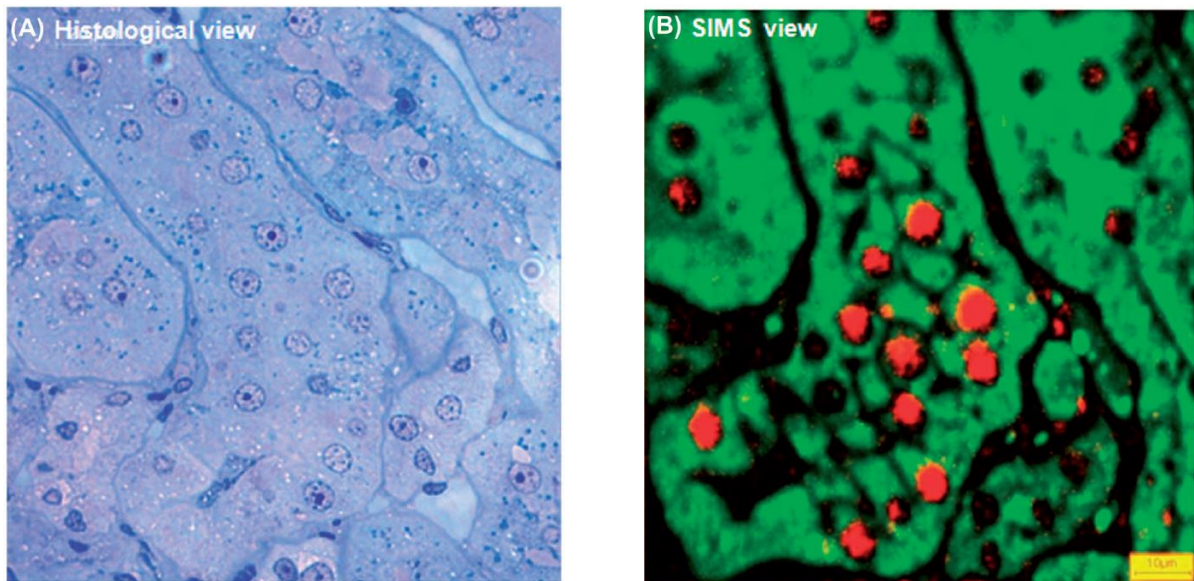
### c. La voie percutanée

La voie percutanée concerne principalement les militaires, ou des civils présents sur des territoires en conflits armés, qui peuvent être blessés par des éclats de munitions contenant de l'uranium, lors de tirs ou de bombardements. Cependant, les travailleurs du cycle du nucléaire peuvent également être exposés à l'uranium par voie sous-cutanée dans le cas d'un accident de travail induisant une blessure ouverte. Après blessure, un fragment (de munition ou de roche) chargé en uranium peut se loger sous la peau et alors rejoindre la circulation sanguine, se propageant ainsi jusqu'aux organes cibles (Petitot et al. 2007a; Petitot et al. 2007b; Petitot et al. 2004; Tymen et al. 2000; Ubios et al. 1997).

## 2. Rétention et élimination

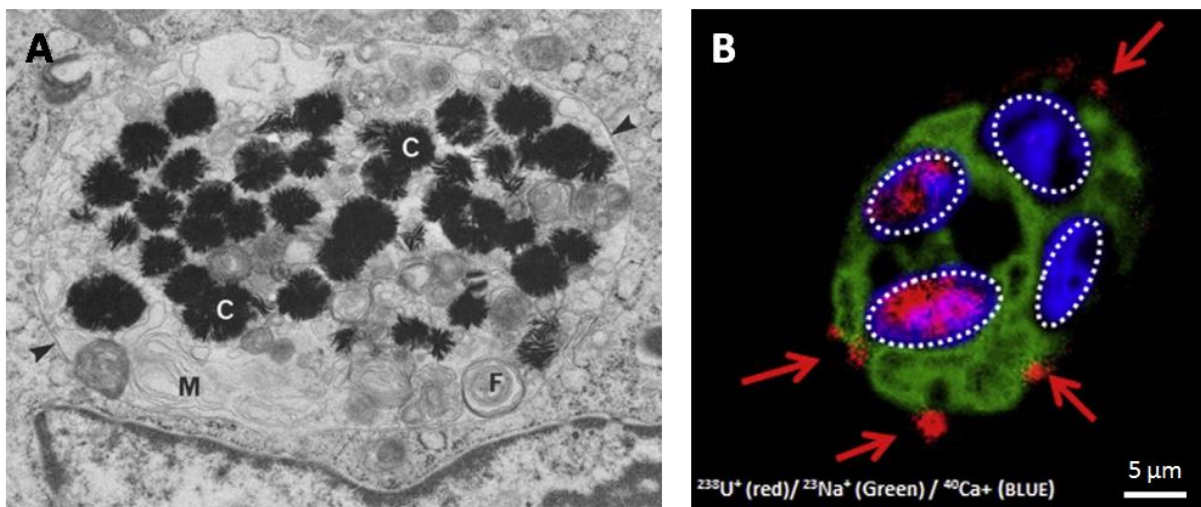
Une fois dans l'organisme, la majorité de l'uranium ingéré est excrétée dans les urines et dans les fèces. Après ingestion, 98% de l'uranium est directement éliminé dans les fèces, sans passer par la circulation sanguine.





**Figure 10: Localisation de l'uranium dans les TCP du rein**

Vue histologique (A) et images ioniques superposées (B) de l'uranium (rouge) et du calcium (vert) dans TCPs dans le cortex rénal de rats après 9 mois d'exposition à l'uranium dans l'eau de boisson. Source : Poisson *et al.* 2014



**Figure 11: Distribution intracellulaire de l'uranium**

(A) Observation au microscope électronique à transmission d'une cellule rénale exposée à 100 µg/mL d'acétate d'uranyle pendant 94 heures. Les cristaux (C) présents dans les uranosomes ont des structures en aiguille. La membrane limitant l'uranosome est indiquée par les flèches noires. (grossissement x 22 000). Source : Ghadially *et al.* 1982. (B) Observation au SIMS des précipités d' $^{238}\text{U}$  autour d'une cellule hépatique et de l'uranium soluble dans les noyaux cellulaires (cercle blancs) après 30 minutes d'exposition à 100µM de nitrate d'uranyle. Source : Guéguen *et al.* 2015

### 3. Distribution

#### a. Distribution tissulaire

Quelle que soit la voie d'exposition, l'uranium se distribue dans l'organisme entier à travers la circulation sanguine, et s'accumule préférentiellement dans les reins et les os, tandis qu'une faible quantité est retrouvée dans le foie (Diamond et al. 1989; La Touche et al. 1987; Leggett and Pellmar 2003; Paquet et al. 2006). Soixante-dix à 80% de l'uranium absorbé par l'organisme est excrété dans les urines dans les premières 24 heures après exposition. Cependant, une partie est réabsorbée dans le rein par le TCP après avoir été filtrée par les glomérules. C'est pourquoi le rein est la première cible des effets toxiques de l'uranium (Craft et al. 2004; La Touche et al. 1987; Leggett 1989).

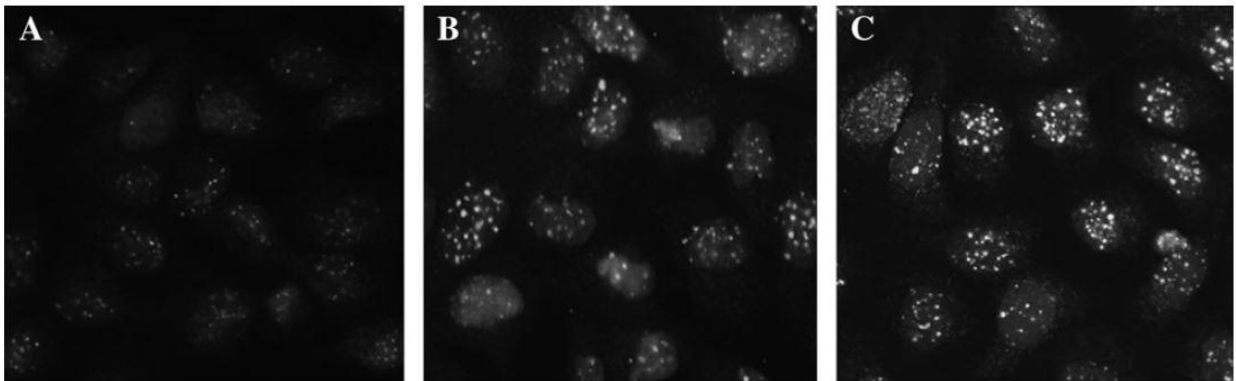
Les ions uranyles ont la particularité de former des complexes avec les groupes phosphates et carbonates présents dans le rein et les os et peuvent partiellement remplacer le calcium des complexes phosphates. Grâce à des analyses effectuées avec une sonde nucléaire PIXE (émission de photons X induite par particules) et à la technique SIMS (secondary ion mass spectrometry), la localisation de l'uranium dans les glomérules, les TCD et les TCP a pu être mise en évidence (**figure 10**) (Homma-Takeda et al. 2015; Homma-Takeda et al. 2009; Poisson et al. 2014). L'os est également un organe de stockage de l'uranium à long terme, puisque les ions uranyles se substituent aux ions calciques dans les cristaux d'hydroxyapatite lors du remodelage osseux (Leggett 1994), avec une accumulation dose et temps dépendante (Pellmar et al. 1999; Zhu et al. 2009).

#### b. Distribution cellulaire

L'uranium est capable de pénétrer dans les cellules rapidement après l'exposition, dans un délai inférieur à 15 minutes (Gueguen et al. 2015; Suhard et al. 2018; Yellowhair et al. 2018). Ce radioélément a été identifié dans la cellule sous forme de précipités denses en électrons appelés uranosomes grâce à la microscopie électronique à transmission (TEM)(**figure 11A**) et sous forme soluble (Suhard et al. 2018; Pierrefite-Carle et al. 2016; Ghadially et al. 1982). À de faibles concentrations non toxiques (<100µM), l'uranium soluble pénètre dans les cellules et est principalement localisé dans le noyau, tandis qu'une fois précipité, celui-ci s'accumule autour des cellules, comme montré en **figure 11B**. L'uranium a également été localisé dans la région péri-nucléaire du cytoplasme, 1 heure après traitement ou durant 7 jours d'exposition continue (Carmona et al. 2018; Gueguen et al. 2015; Reisser-Rubrecht et al. 2008; Rouas et al. 2010; Suhard et al. 2018).

### C. Toxicité

L'uranium étant à la fois un radionucléide et un métal lourd, ses propriétés chimiques et radioactives doivent être prises en compte lors des études de toxicité. La toxicité de l'uranium dépend du sexe, de l'âge, et du modèle d'exposition, mais plus spécifiquement de la voie d'exposition, de sa spéciation, et de sa solubilité. Dans le cas d'une ingestion chronique, un NOAEL avait été établi à 0,96 mg.L<sup>-1</sup>, basé sur des atteintes histologiques rénales mais sans aggravation pour les doses supérieures (Gilman et al. 1998). Néanmoins des études plus récentes d'exposition chronique à l'uranium ont remis en question ce seuil. Il a ainsi été montré l'existence de seuils LOAEL, estimés différents selon l'organe observé : 0,2 mg.L<sup>-1</sup> pour le cerveau, 2 mg.L<sup>-1</sup> pour le foie, 10 mg.L<sup>-1</sup> pour le rein et 20 mg.L<sup>-1</sup> pour l'intestin pour des rats adultes (Dublineau et al. 2014; Gueguen et al. 2014). C'est grâce à la combinaison de ces résultats avec ceux d'études épidémiologiques qu'une valeur guide de l'uranium



**Figure 12: Induction des cassures double brin à l'ADN dans le noyau de cellules rénales exposées à l'uranium**

Immunomarquage de  $\gamma$ -H<sub>2</sub>AX, la forme phosphorylée de l'histone H<sub>2</sub>AX induite en réponse aux cassure double-brin dans la lignée NRK-52<sup>E</sup> exposée durant 24 heures à 0, 200 ou 600  $\mu$ M d'UA, sous la forme de nitrate d'uranyle. Source : Thiébault *et al.* 2007

pour l'eau de boisson de  $30 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  a été estimée comme sans risque pour les adultes par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (IRSN 2017).

### 1. Toxicité chimique versus radiotoxicité

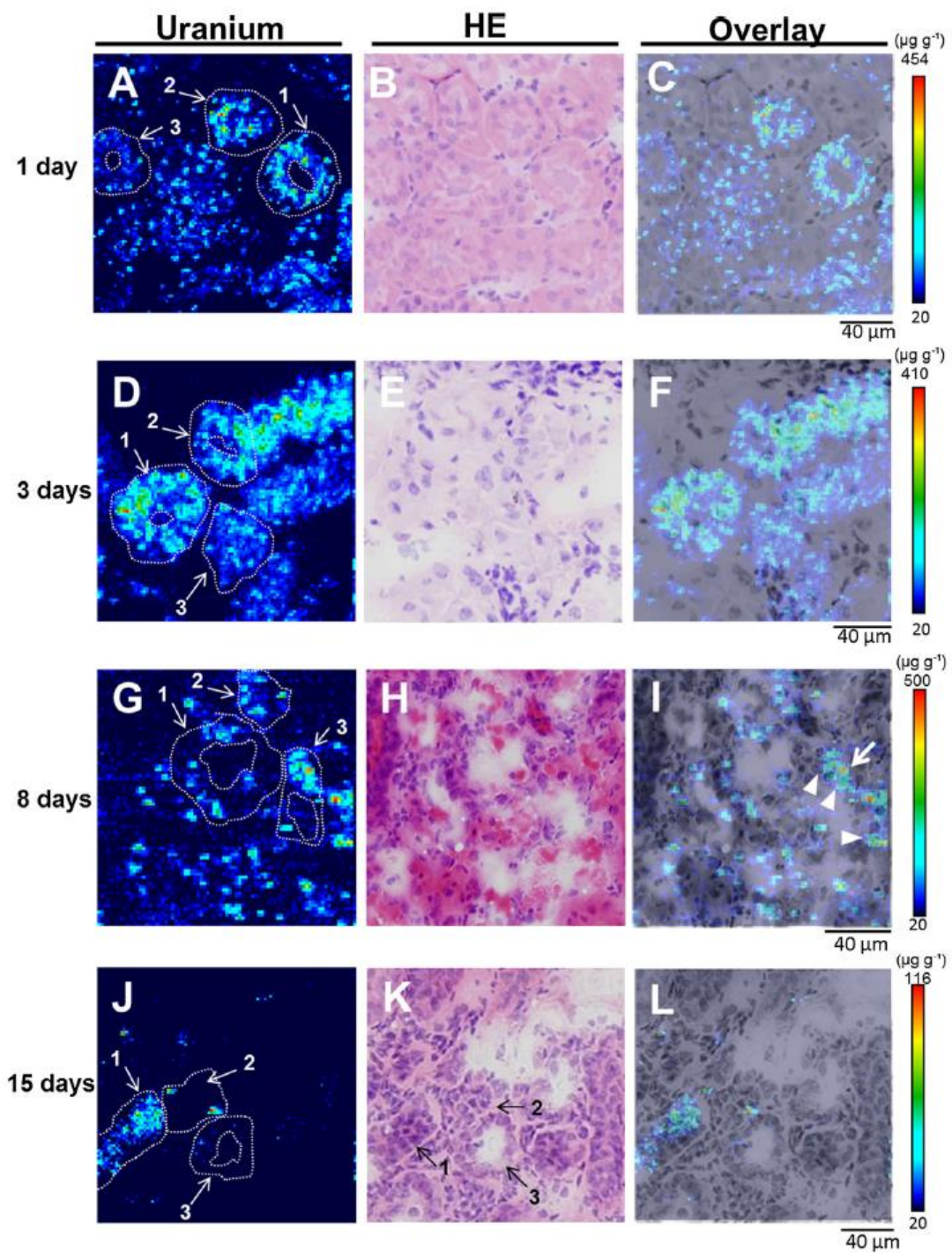
Du fait de ses propriétés physico-chimiques, l'uranium possède non seulement une toxicité chimique, mais également une radiotoxicité, dépendante de sa composition isotopique (Guéguen et al. 2017; Miller 2007; UNSCEAR 2016; Vicente-Vicente et al. 2010). La cible principale de la toxicité chimique de l'uranium est le rein, due à la solubilité du toxique, tandis que sa radiotoxicité est principalement décrite dans les voies respiratoires après une exposition à des composés moins solubles (ATSDR 2013).

L'UA ne présente que 60% de la radioactivité de l'uranium naturel, tout en conservant ses propriétés chimiques (WHO 2001). La plupart des études de toxicité de l'UN et l'UA considèrent que les propriétés chimiques de l'uranium prédominent, tandis que les expositions à l'UE semblent présenter des effets additifs entre les propriétés toxiques chimiques et radioactives de ce composé (UNSCEAR 2016; Vicente-Vicente et al. 2010). En effet, selon de nombreuses études, la principale toxicité de l'uranium serait due au fait que ce soit un métal lourd, et non pas à ces propriétés radioactives (Darolles et al. 2010; Miller et al. 2002a; Novikov lu 1972; Priest et al. 1982). Cependant, l'uranium est capable d'induire des cassures à l'ADN simple- et double-brin (CSB ou CDB) (**figure 12**), effets généralement induits lors d'une radiotoxicité. En utilisant trois composés d'uranyle nitrate avec des concentrations en isotopes légèrement différentes, et par conséquent avec trois activités spécifiques différentes, Miller et al. ont montré *in vitro* que même l'UA pouvait induire des effets liés aux radiations, tels que de la mutagénèse (Miller 2007) et la fréquence de transformation néoplastique des cellules (Miller et al. 2002b).

### 2. Génotoxicité

Une fois entré dans le noyau, l'uranium peut engendrer des dommages à l'ADN de deux manières : par une interaction directe avec les brins d'ADN ou les protéines associées, ou indirectement par l'induction d'un stress oxydatif.

En effet, les ions uranyles sont capables de se lier au groupe phosphate des acides nucléiques (Ansoberlo et al. 2006; Dedieu et al. 2009; Huxley and Zubay 1961; Nielsen et al. 1992; Wu et al. 1996), formant ainsi des adduits de manière dose et temps dépendante (Stearns et al. 2005; Yellowhair et al. 2018). La formation d'adduits à l'ADN peut être une des causes menant à des cassures, des liaisons transversales, ou encore la formation de sites abasiques (Wilson et al. 2014). De plus, cette interaction de l'uranium avec la chaîne d'ADN peut induire une congestion spatiale, et par conséquent une altération des mécanismes de réparation à l'ADN en empêchant les protéines de réparation de se lier aux brins d'ADN (Hartsock et al. 2007). En effet, l'uranium altère les mécanismes de réparation de l'ADN dans des cellules épithéliales bronchiales, engendrant ainsi une augmentation du nombre de CDB dans les cellules (Jin et al. 2017). La voie de recombinaisons homologues (HR) est altérée *via* l'inhibition des protéines ATM, BRCA1, RPA80 et EXO1, tandis que la voie de jonction d'extrémités non homologues (NHEJ) est altérée *via* l'inhibition des DNA-PKcs et de 53BP1 (Jin et al. 2017; Pereira et al. 2012). Il semblerait que l'altération des voies de réparation par excision de base (BER) et par excision de nucléotide (NER) soit également impliquée dans les dommages à l'ADN induits par l'uranium (Yellowhair et al. 2018).



**Figure 13: Distribution de l'uranium dans les segments S3 des TCP après injection chez le rat**

Les images montrent la localisation de l'uranium par fluorescence X induite par rayonnement synchrotron (A, D, G, J) et les sections sériées associées colorées à l'hématoxyline-éosine (B, E, H, K). Une superposition des deux images est présentée (C, F, I, L). Source : Homma-Takeda *et al.* 2015

L'uranium induit des dommages à l'ADN liés au stress oxydatif, notamment par la formation du marqueur 8-hydroxydésoxyguanosine (8-OHdG) (Garmash et al. 2014; Hamilton et al. 1997; Hawkins and Davies 2001; Smirnova et al. 2005). La formation de 8-OHdG par l'uranium est dose et temps dépendante *in vitro*. De plus, cette dernière peut être inhibée par l'induction de l'enzyme antioxydante SOD, démontrant bien l'implication du stress oxydatif dans l'induction des dommages à l'ADN (Miller et al. 2002a).

En conséquence, l'uranium peut induire des cassures à l'ADN (Jin et al. 2017; Monleau et al. 2006a; Monleau et al. 2006b; Thiebault et al. 2007), la formation de micronoyaux (Lin et al. 1993), et des effets clastogéniques (provoquant des dommages structuraux sur les chromosomes) (LaCerte et al. 2010; Wise et al. 2007) et aneugéniques (provoquant des anomalies du nombre de chromosomes) (Miller 2006; Nriagu et al. 2012).

La majorité des études démontrent que la génotoxicité de l'uranium serait principalement due à ses propriétés de métal lourd, et non pas à sa radioactivité (Asic et al. 2017). Cependant, en comparant 3 composés de nitrate d'uranyle ( $^{238}\text{U}$ , UA et  $^{235}\text{U}$ ) possédant chacun une radioactivité spécifique, mais avec des propriétés chimiques identiques, Miller et al. (2002) ont démontré que la clastogénicité induite par l'uranium était directement corrélée à la radioactivité (Miller et al. 2002b).

Enfin, des études épidémiologiques ont démontré que les populations vivant sur des territoires contaminés à l'uranium avaient un taux élevé de lésions et d'aberrations chromosomiques, en relation avec l'exposition (Fister and Jovic 2014; Ibrulj et al. 2007; Milacic and Simic 2009).

### 3. Néphrotoxicité

Le rein est l'organe cible principal de la toxicité de l'uranium après absorption et des effets rénaux délétères peuvent apparaître après une exposition à l'uranium. Les mécanismes moléculaires et cellulaires de néphrotoxicité de l'uranium menant à ces effets sont décrits dans la revue intitulée « adverse outcome pathways for uranium-induced kidney toxicity », dans la partie D de ce chapitre d'introduction, nommée « la néphrotoxicité de l'uranium : des mécanismes moléculaires aux effets biologiques et épidémiologiques ».

L'uranium est filtré à travers la membrane glomérulaire et passe à travers les TCP, où il s'accumule dans les régions corticales et juxtaglomérulaires (Homma-Takeda et al. 2015; Homma-Takeda et al. 2009; Poisson et al. 2014; Tessier et al. 2012). Ensuite, l'uranium est réabsorbé par la bordure en brosse des cellules épithéliales, induisant une néphrotoxicité symptomatique. La localisation de l'uranium dans le rein dépend du temps d'exposition, comme l'ont démontré Tessier et al. (2012) avec la méthode SIMS. Après une exposition chronique de 12 mois, l'uranium est principalement localisé dans les TCP, tandis qu'après 18 mois, ce dernier est retrouvé dans tous les segments du néphron, y compris les glomérules (Tessier et al. 2012). De nombreuses études ont démontré que l'uranium était distribué dans l'épithélium du segment 3 des TCP après une exposition aiguë à l'uranium chez le rat (**figure 13**), et plus particulièrement dans les micro-régions voisines du noyau, où l'uranium s'accumule à de fortes concentrations, étant jusqu'à 100 fois supérieure à la concentration rénale moyenne (Homma-Takeda et al. 2015; Homma-Takeda et al. 2009; Kitahara et al. 2017; Poisson et al. 2014; Tessier et al. 2012).



Une exposition aiguë à l'uranium induit des atteintes tissulaires, avec l'apparition de lésions dans les TCP et une perte de fonction rénale (Banday et al. 2008; Haley 1982). Après une exposition chronique associée à une accumulation tissulaire élevée, il a été démontré que l'uranium induisait également une IR (Haley et al. 1982; Ortega et al. 1989; Zhu et al. 2009), tandis que d'autres études n'ont révélé aucune altération rénale chez les rongeurs après une exposition chronique à des doses cumulées pourtant toxiques lorsqu'elles sont délivrées de manière aiguë (Dublineau et al. 2014; Grison et al. 2016; Gueguen et al. 2014; Poisson et al. 2014). Ces résultats soulèvent donc des questionnements sur les effets de l'uranium à faibles doses et sur la mise en place d'une éventuelle réponse adaptative lors d'une exposition chronique.

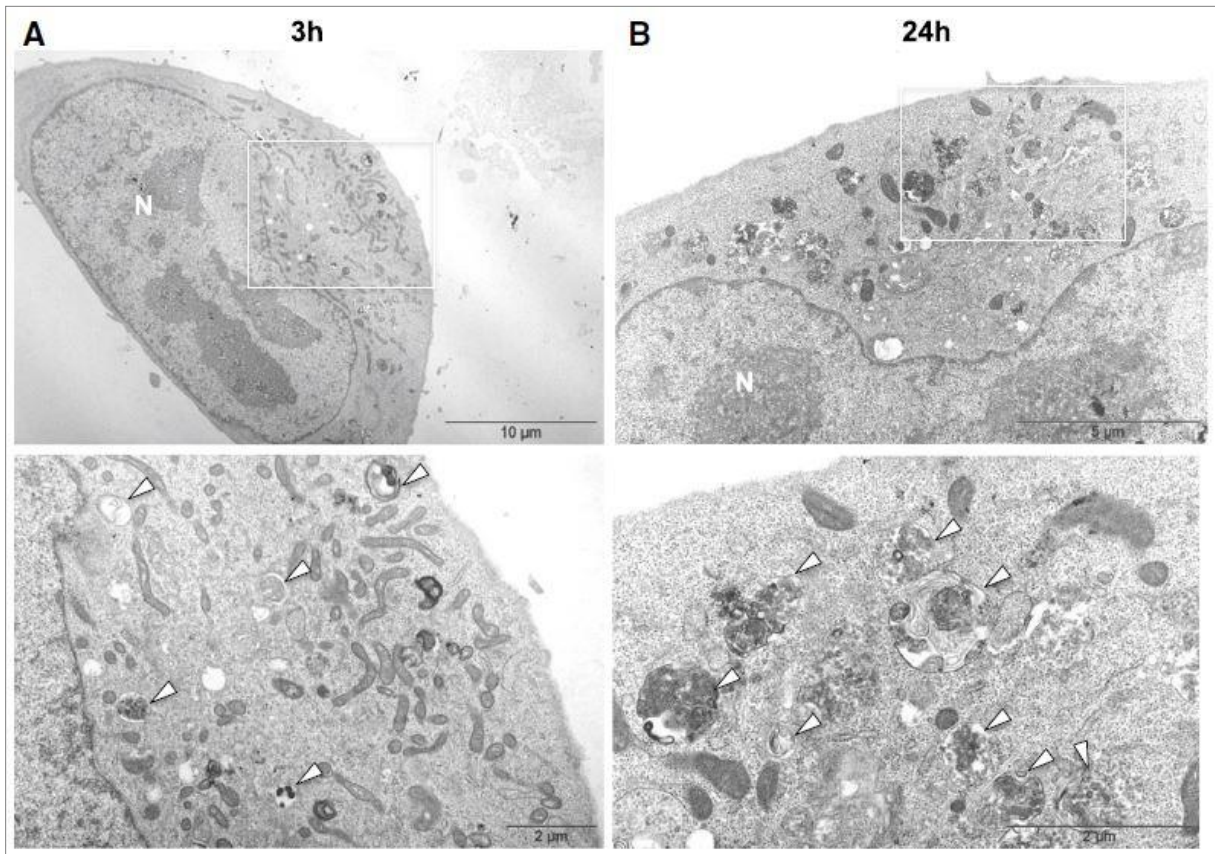
Des études épidémiologiques ont également démontré que l'uranium pouvait avoir des effets rénaux. En effet des populations buvant des eaux issues de puits privés fortement concentrées en uranium (2 à 781 µg/L) présentent une augmentation de l'excrétion urinaire du glucose, du calcium et du phosphate. Cependant, la clairance de la créatinine ainsi que le taux de protéines urinaires ne sont pas modifiées, indiquant l'absence d'atteinte glomérulaire (Kurttio et al. 2002; Zamora et al. 1998). Zamora et al. (1998) ont également mis en évidence une induction de PAL et de la protéine B2MG, témoignant d'une atteinte rénale. Cependant, bien qu'une tendance ait été observée dans l'induction de B2MG chez une population buvant des eaux contenant 0.2 à 470 µg/L, aucune néphrotoxicité n'a pu être mise en évidence, et ce malgré une concentration en uranium urinaire plus de 8 fois supérieure à la normale (Selden et al. 2009). Les études épidémiologiques n'ont pas démontré d'augmentation de la mortalité par maladies urogénitales ou rénales chez des cohortes professionnellement exposées à l'uranium (Boice et al. 2018; Checkoway et al. 1988; Dupree et al. 1987; Lundin 1969; Polednak and Frome 1981), et la majorité des études de suivis à long terme n'ont pas montré l'induction de dommages rénaux après exposition à l'uranium (ATSDR 2013; Eisenbud and Quigley 1956; Luessenhop et al. 1958). Des résultats similaires ont été obtenus dans les cohortes de militaires ou de civils exposés à l'uranium durant la guerre du Golfe (McDiarmid et al. 2004; McDiarmid et al. 2007; McDiarmid et al. 2006; McDiarmid et al. 2000).

#### 4. Toxicité osseuse

Comme décrit précédemment, l'os est connu pour être un organe de stockage de l'uranium sur le long terme, faisant ainsi de lui l'une des premières cibles de sa toxicité (ATSDR 2013; Leggett 1994; UNSCEAR 2016). En effet, les ions uranyles sont capables de remplacer le calcium des complexes d'hydroxyapatite, ce qui expliquerait son tropisme osseux après absorption de composés solubles (Bourgeois et al. 2015; Leggett 1994; Moss 1985; Rodrigues et al. 2013; Wrenn et al. 1985). Cette accumulation dans les os se fait principalement sur le long terme, de manière dose et temps dépendante (Pellmar et al. 1999; Zhu et al. 2009).

Il a été démontré que l'uranium pouvait inhiber la formation osseuse et induire une résorption osseuse après une exposition aiguë par injection (0.2 à 2 mg/kg) (Diaz Sylvester et al. 2002; Fukuda et al. 2006; Ubios et al. 1991). L'induction d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) dans les ostéoblastes, augmenterait ainsi la toxicité cellulaire de l'uranium en diminuant la différenciation ostéoblastique *in vitro* à des doses comprise entre 0.1 et 100 µM (Tasat et al. 2007), et menant à une induction de l'apoptose partiellement médiée par la voie p38-MAPK dans les ostéoblastes MC3T3-E1 (Hao et al. 2016). On peut émettre l'hypothèse que l'inhibition de la différenciation des ostéoblastes est en partie médiée par les voies ERK et NFκB, comme cela a déjà été démontré chez des ostéoblastes





**Figure 14: Observation de l'autophagie induite dans des cellules ostéoblastiques après exposition à l'uranium**

Observation au microscope électronique à transmission des cellules UMR-106 après une exposition de 3 (A) ou 24 heures (B) à 300  $\mu\text{M}$  d'uranium. Les flèches blanches indiquent les vésicules autophagiques, tandis que le noyau est localisé par la lettre N. Source : Pierrefite-Carle *et al.* 2016

traités à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Bai et al. 2004; Mody et al. 2001). Les ostéocytes sont les cellules majoritaires du tissu osseux et sont incorporés dans la matrice osseuse dans laquelle est stockée l'uranium. Ces cellules sont ainsi exposées de manière chronique et présentent une résistance à la cytotoxicité induite par l'uranium. Cependant, il a été démontré *in vitro* qu'une exposition chronique induisait une altération de la fonction de minéralisation des ostéocytes, dès la concentration de 5 µM (Hurault et al. 2019).

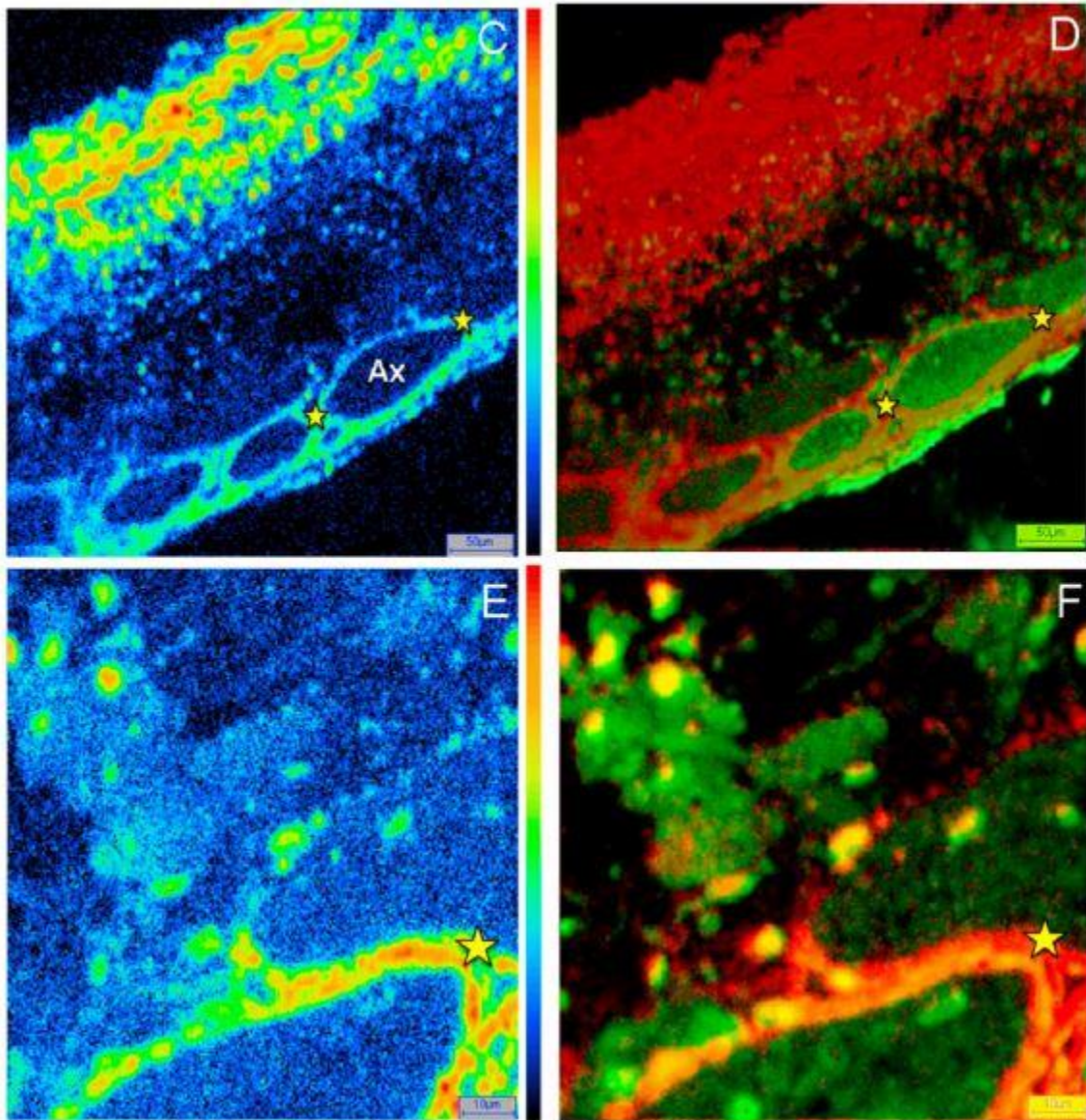
Lors d'expositions chroniques à l'uranium, une diminution de l'expression génique de protéines impliquées dans le métabolisme osseux a été observée, en corrélation avec une diminution de la surface osseuse de l'os fémoral cortical (Wade-Gueye et al. 2012). Chez le rat exposé de manière chronique à 40 mg/L (soit 2 mg/kg/jour), l'uranium interfère avec la production et le métabolisme de la vitamine D, une hormone essentielle à la minéralisation et à l'homéostasie osseuse (Arzuaga et al. 2015; Tissandie et al. 2007). Les effets de l'uranium sur la voie de la vitamine D sont d'autant plus importants que ce dernier diminue l'expression du récepteur à la vitamine D dans les os de rats exposés chroniquement à 40 mg/L dès la naissance (Wade-Gueye et al. 2012).

*In vitro*, l'uranium peut induire des effets génotoxiques, avec notamment l'apparition de mutations géniques, d'aberrations chromosomiques et la formation de micronuclei. Enfin, ces altérations se traduisent par une augmentation de la mort cellulaire (Miller et al. 2003). Une étude comparative d'expression de gènes menée après des expositions aiguës sur différentes lignées cellulaires a révélé que les ions uranyles affectaient notamment l'excrétion de l'OPN, une protéine jouant un rôle dans la minéralisation osseuse (Prat et al. 2010). Cela pourrait expliquer la modulation de la minéralisation observée sur les cellules ostéoblastiques par l'uranium, et ce même à des doses subtoxiques (<100 µM) (Pierrefite-Carle et al. 2016). Dans cette même étude, l'autophagie est induite rapidement, dès 100 µM, mais est ensuite inhibée 24 heures après traitement (**figure 14**), suggérant ainsi que l'uranium peut perturber la fonction des ostéoblastes en inhibant le flux autophagique, ce qui résulte dans la diminution de la capacité de minéralisation (Pierrefite-Carle et al. 2016). En revanche, une induction de l'autophagie a été constatée dans les ostéocytes traités durant 24 heures avec 400 et 600 µM d'uranium (Hurault et al. 2019).

Un déficit en densité minérale osseuse a été observé chez des vétérans de la Guerre du Golfe ayant plus de 50 ans et qui ont été exposés à l'UA par blessure (McDiarmid et al. 2018). Cependant aucune toxicité osseuse n'avait été suggérée dans des cohortes plus jeunes, suggérant que les effets toxiques de l'uranium sur les os pourraient se manifester à un âge plus avancé.

### 5. Hépatotoxicité

Après exposition aiguë, l'uranium induit des lésions histologiques hépatiques et une augmentation des transaminases (Domingo et al. 1987; Gueguen et al. 2006; Pasanen et al. 1995). Une modification de l'expression génique d'enzymes impliquées dans le métabolisme de xénobiotiques (Chung and Lee 2006; Chung 2003; Moon 2003; Yu et al. 2002), ainsi qu'une perturbation de l'activité des cytochromes P450 (CYP) est observée (Gueguen et al. 2006; Pasanen et al. 1995). Une exposition chronique induit également une modification des enzymes du métabolisme de phase I (Souidi et al. 2005) et un dysfonctionnement du métabolisme des xénobiotiques chez le rat, notamment du paracétamol, sans perturber leur activité enzymatique après 9 mois de contamination à 40 mg/L d'eau de boisson (soit 2 mg/kg/jour) (Gueguen et al. 2007; Rouas et al. 2009).



**Figure 15: Cartographie de l'uranium dans l'épithélium neural olfactif après instillation nasale chez le rat par méthode SIMS**

Les rats sont exposés par instillation nasale à une solution de 10 mg/mL d'uranium appauvri. L'image ionique de  $^{238}\text{U}$  (C) montre que l'uranium est localisé dans l'épithélium neural où se trouvent les corps cellulaires des neurones olfactifs et autour des axones tel qu'indiqué par les étoiles jaunes. On peut voir la superposition de l'image ionique de  $^{238}\text{U}^+$  (rouge) et du  $^{40}\text{Ca}^+$  (vert) (D). Les images (E) et (F) représentent les images (C) et (D) à un plus fort grossissement. Source : Ibanez *et al.* 2014

*In vitro*, de fortes concentrations en uranium induisent la mort des cellules hépatiques HepG2, par apoptose ou nécrose (Gueguen et al. 2015; Pourahmad et al. 2006; Rouas et al. 2010). *In vivo*, l'induction d'apoptose par la phosphorylation, et donc l'activation de la voie JNK dans les cellules du foie a été mise en évidence chez des rats exposés par injection intrapéritonéale à 2.5 à 10 mg/kg d'uranium (Yuan et al. 2017). Dans cette même étude, Yuan *et al.* ont démontré que le stress oxydant et l'apoptose induits par l'uranium provenaient, du moins partiellement, de la diminution de la synthèse de sulfure d'hydrogène (H<sub>2</sub>S) endogène. En effet, ce gaz endogène est un médiateur des effets antioxydants, anti-inflammatoires et cytoprotecteurs dans le foie. La diminution de ces enzymes de synthèse (cystathionine β-synthase et cystathionine γ-ligase) induite par l'uranium, provoque la diminution du taux de H<sub>2</sub>S endogène, et ainsi une diminution des défenses antioxydantes (SOD, CAT, GPX, GST), une diminution du ratio Bcl-2/Bax, augmentant ainsi l'activité apoptotique des cellules hépatiques (Yuan et al. 2017).

### 6. Toxicité sur le système nerveux central

L'uranium est très peu présent dans le système nerveux central suite à une ingestion d'eau contaminée (Paquet et al. 2006). Les mécanismes du transfert de l'uranium depuis la circulation sanguine jusqu'au cerveau sont encore peu connus à l'heure actuelle. Cependant, il existe plusieurs hypothèses sur les voies d'entrée de l'uranium jusqu'au cerveau, notamment celle de la voie vasculaire ou parenchymateuse (Lemerrier et al. 2003). Après inhalation ou instillation, le transport de l'uranium se fait le long du nerf olfactif, jusqu'aux bulbes olfactifs (**figure 15**) (Ibanez et al. 2014). Au niveau cellulaire, l'uranium passerait par les transporteurs du fer : le récepteur à la transferrine TFR, ou DMT1 (divalent metal transporter 1) (Fitsanakis et al. 2006).

Plusieurs études menées chez le rongeur ont montré des modifications comportementales après des expositions à l'uranium, avec une altération transitoire de la mémoire (Barber et al. 2007), des modifications neuromotrices (Briner and Murray 2005), ou encore des modifications du cycle veille/sommeil (Lestaevel et al. 2005) et une augmentation de l'anxiété (Houpert et al. 2005).

Les effets observés à ce jour pourraient être dus notamment à l'induction d'un stress oxydatif. En effet, la peroxydation lipidique est augmentée dans le cerveau de rats après deux semaines de contamination à 150 mg/L, et disparaît après 6 mois, suggérant la mise en place de systèmes compensatoires (Briner and Murray 2005). Des concentrations plus faibles d'uranium (10, 20 et 40 mg/L) induisent également un stress oxydatif au bout de trois mois de contamination à l'uranium, avec une élévation des TBARS et du GSSG, et une induction des enzymes antioxydantes CAT et SOD (Linares et al. 2007). Ce stress oxydatif serait associé à des troubles de l'activité locomotrice, de l'anxiété, et de la dépression chez des rats exposés à 40 mg/L d'uranium depuis la naissance jusqu'à l'âge de 10 semaines (Lestaevel et al. 2015). Cependant, des effets pro-oxydants ont été observés dans le cortex des rats contaminés à l'UE, mais pas après une contamination à l'UA, indiquant bien l'importance de la double toxicité de l'uranium chimique et radiologique (Lestaevel et al. 2009).

### 7. Reprotoxicité

Chez les rongeurs femelles, il a été démontré qu'une exposition à l'uranium pouvait induire une modification de la maturation des ovocytes (Feugier et al. 2008; Kundt et al. 2009) et de la folliculogénèse après deux semaines d'exposition (5 à 400 mg/L – 1,25 à 100 mg/kg/jour) d'uranium



dans l'eau de boisson (Arnault et al. 2008). Chez les rats mâles, il a été constaté une diminution de la fertilité après une exposition chronique de 3 mois dans l'eau de boisson, à des doses comprises entre 10 et 40 mg/kg/jour d'uranium (Linares et al. 2005).

Il semblerait que l'uranium agisse en diminuant la prolifération cellulaire de cellules ovariennes de hamster chinois, induisant également la formation de micronoyaux et d'aberrations chromosomiques à des concentrations allant de 10 à 300  $\mu\text{M}$  (Lin et al. 1993). Dans le même modèle cellulaire, des concentrations de 200 et 300  $\mu\text{M}$  d'uranium ont également induit des adduits à l'ADN et des mutations du gène *hprt* (Stearns et al. 2005).

En conséquence, l'uranium pourrait induire l'apoptose par l'activation de la caspase effectrice 3 dans les ovaires et les testicules fœtaux humains, tel que démontré lors d'études *in vitro* (Angenard et al. 2011).

Les études épidémiologiques ne démontrent pas d'effets délétères de l'uranium sur le système reproducteur chez l'Homme (ATSDR 2013), cependant il existe une étude qui a démontré l'apparition de maladies congénitales chez la descendance de personnes exposées à l'uranium par inhalation (Hindin et al. 2005).

### **8. Toxicité sur le système respiratoire**

Le poumon est le premier organe d'accumulation de l'uranium après inhalation. Sa localisation pulmonaire dépend de la taille des particules et de leur solubilité (ATSDR 2013; Leach et al. 1970; UNSCEAR 2016).

*In vivo*, une inflammation ainsi que des œdèmes pulmonaires ont été détectés chez différentes espèces animales après inhalation d'uranium (ATSDR 2013). En effet, il a été démontré qu'une telle exposition induisait la production de radicaux libres, ainsi que l'induction de l'expression et de la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-8, le TNF- $\alpha$ , and l'IL-10 dans les poumons (Lang et al. 1994; Monleau et al. 2006b; Pasanen et al. 1995). De plus, l'apparition de CDB d'ADN dans des cellules issues de lavages broncho-alvéolaires chez le rat est observée, avec un effet de potentialisation après des inhalations répétées, dépendant de la taille et de la forme chimique de l'uranium (Monleau et al. 2006a; Monleau et al. 2006b).

Ces effets génotoxiques ont été retrouvés *in vitro* dans des fibroblastes pulmonaires et des cellules épithéliales bronchiales après une exposition au nitrate d'uranyle avec la formation d'adduits à l'ADN et l'apparition de mutations du gène *hprt* (Jin et al. 2017; Miller 2007). La formation des CDB serait dose-dépendante dans les cellules épithéliales bronchiales, et impliquerait une altération des systèmes de réparation à l'ADN par recombinaisons homologues et non-homologues (Jin et al. 2017).

*In vitro*, il a également été démontré qu'une contamination à l'uranium de 0.25 à 1 mM pouvait induire un stress oxydatif, corrélé à une augmentation de la peroxydation lipidique et à une diminution de l'expression de GSH et de SOD-2 dans des cellules épithéliales pulmonaires de rat (Periyakaruppan et al. 2007). Dans le même modèle cellulaire, une induction de l'apoptose a été observée à partir d'une concentration de 0.5 mM d'uranium, médiée par les caspases 8 et 3 (Periyakaruppan et al. 2009).



Une étude épidémiologique menée sur 30 ans a démontré une augmentation de la mortalité par cancer du larynx ou par pneumonie chez des travailleurs du cycle du nucléaire, mais pas par cancer pulmonaire (Dupree et al. 1987). Une mortalité plus élevée a également été mise en évidence dans une cohorte de mineurs de l'uranium, avec en cause l'apparition de maladies respiratoires bénignes (Boice et al. 2008). Cependant, les deux études démontrent que la première cause de mortalité ne serait pas due à l'uranium, mais aux conditions de travail dans les mines souterraines et aux co-expositions, notamment au radon ( $^{222}\text{Rn}$ ) et au chlore (Cl). En effet, 3000 cancers/an en France seraient dus à une exposition intérieure au radon, impliquant que le radon serait responsable d'environ 9.6% des morts par cancer du poumon (Ajrouche et al. 2018).

### 9. Toxicité sur le système hémato-immunitaire

L'uranium est capable de moduler l'immunité chez la souris, d'une manière dépendante du type de traitement (chronique ou aigu) et de la voie d'exposition. Les macrophages ont été identifiés comme une cible de la cytotoxicité de l'uranium (Kalinich et al. 2002; Wan et al. 2006), avec l'apparition d'apoptose ou de nécrose dans les macrophages péritonéaux ou dans les lymphocytes T spléniques *in vitro*, aux doses respectives de 100  $\mu\text{M}$  et de 500 $\mu\text{M}$  (Wan et al. 2006). Une exposition chronique à l'uranium chez la souris diminue effectivement la proportion de lymphocytes T dans la rate, mais augmente la proportion de lymphocytes B ainsi que leur maturation (Hao et al. 2013). Bien qu'une diminution de la prolifération des lymphocytes B soit observée 4 jours après un traitement aigu à 10 mg/kg *in vivo* (Hao et al. 2012), et une dose de 200  $\mu\text{M}$  semble induire la prolifération des lymphocytes T deux heures après exposition *in vitro* (Wan et al. 2006).

Après quatre mois d'exposition chronique à l'uranium *via* l'alimentation à une dose d'environ 40 mg/kg/jour, il a été observé une inhibition de l'immunité innée chez la souris, avec notamment une diminution de la capacité à tuer des lymphocytes NK, de la capacité à lutter contre les infections et de la sécrétion de TNF- $\alpha$ , d'IL-1 $\beta$  et d'IL-18 par les macrophages péritonéaux (Hao et al. 2013). De plus une élévation des taux d'IgG et d'IgE dans le sang a été observée, ce qui pourrait conduire à une augmentation du risque de développer des allergies (Hao et al. 2013). Des études moléculaires menées sur des macrophages et des lymphocytes murins ont également montré que l'uranium modulait l'expression génique de c-jun, NF $\kappa$ B-p65, ou encore des gènes codant pour des chemokines ainsi que leurs récepteurs. Ces résultats laissent alors supposer que l'uranium pourrait favoriser l'apparition de maladies auto-immunes en lien avec la polarisation des lymphocytes T en T helper (Th) 2 (Wan et al. 2006). Chez la souris, l'uranium induit également une diminution de la sécrétion des cytokines pro-Th1 IFN- $\gamma$  et TNF- $\alpha$  et une augmentation de la sécrétion des cytokines pro-Th2 IL-4 et IL-10 par les cellules spléniques, déséquilibrant ainsi la balance des cytokines Th1/Th2 dans la rate, en faveur d'un profil Th2 (Hao et al. 2013).

Peu d'études épidémiologiques ont été réalisées sur le système hémato-immunitaire, cependant certaines ont examiné les taux de globules blancs ou encore la mortalité induite par des maladies immunitaires et n'ont démontré aucun effet de l'uranium après une exposition par ingestion, inhalation ou exposition cutanée (Archer et al. 1973; Checkoway et al. 1988; Cragle et al. 1988; Keane and Polednak 1983; Polednak and Frome 1981; Vich and Kriklava 1970).





### **D. La néphrotoxicité de l'uranium: des mécanismes moléculaires aux effets biologiques et épidémiologiques**

Une seconde revue a été écrite lors de cette thèse afin de proposer un modèle AOP (Adverse Outcome Pathways) visant à expliquer les différents événements moléculaires et les mécanismes biologiques à l'origine de la néphrotoxicité induite par l'uranium.



**ARTICLE 2**

**ADVERSE OUTCOME PATHWAYS FOR URANIUM-INDUCED KIDNEY TOXICITY**

Alice Bontemps and Yann Guéguen

À soumettre



## ADVERSE OUTCOME PATHWAYS FOR URANIUM INDUCED KIDNEY TOXICITY

Alice Bontemps<sup>1</sup> and Yann Guéguen<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), PSE-SANTE, SESANE, LRTOX Fontenay-aux-Roses, France.

<sup>2</sup>Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), PSE-SANTE, SESANE, LRSI Fontenay-aux-Roses, France.

\*Correspondence to:

[yann.gueguen@irsn.fr](mailto:yann.gueguen@irsn.fr), Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), PSE-SANTE, SESANE, LRSI, Fontenay-aux-Roses, France

### Abbreviations

8-OHdG, 8-hydroxydeoxyguanosine ; AIF, apoptosis-inhibitor factor ; ALP, alkaline phosphatase ; AOP, adverse outcome pathway ; ATF6, activating transcription factor 6 ; ATP, adenosine triphosphate ; B2MG,  $\beta$ 2-microglobulin ; Bax, Bcl-2 associated X protein ; Bcl-2, B-cell lymphoma 2 ; BER, base excision repair ; CAT, catalase ; CBS, cystathionine  $\beta$ -synthase ; CHOP, CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein ; COX-2, cyclooxygenase 2 ; CRP, C-reactive protein ; cyt, cytochrome ; DDR, DNA damage repair ; DSB, double-strand break ; DU, depleted uranium ; ER, endoplasmic reticulum ; ERK, extracellular signal-regulated kinase ; ETHE1, ethylmalonic encephalopathy 1 ; EU, enriched uranium ; GFR, glomerular filtration rate ; H<sub>2</sub>S, hydrogen sulfide ; GSK3 $\beta$ , glycogen synthase kinase 3 beta ; HR, homologous recombination ; ILR, interleukin receptor ; iNOS, nitric oxide synthase ; IP, intra-peritoneal ; JNK, c-Jun N-terminal kinase ; micro-PIXE, microbeam scanning particle-induced X-ray emission ; micro-XAFS, micro-X-ray absorption fine-structure ; MMP, mitochondrial membrane potential ; NaPi-IIa, sodium-dependent phosphate co-transporter ; NER, nucleotide excision repair ; NF- $\kappa$ B, nuclear transcription factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells ; NHEJ, non-homologous end-joining ; Nox4, NADPH oxidase 4 ; Nrf2 nuclear factor erythroid 2-related factor 2 ; p38 MAPK, p38 mitogen-activated protein kinase ; PARP-1, poly [ADP-ribose] polymerase 1 ; CSE, cystathionine  $\gamma$ -lyase ; PCT, proximal convoluted tubule ; PERK, protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase ; PSMA6, proteasome subunit alpha type-6 ; PSMB7, proteasome subunit beta type-7 ; ROS, reactive oxygen species ; SIMS, secondary ion mass spectrometry ; SOD, enzyme superoxide dismutase ; SR-XRF, synchrotron radiation X-ray fluorescence ; SSB, single strand breaks ; TLR, toll-like receptor ; TNFR, tumor necrosis factor receptor ; U, uranium ;



## Background

Uranium (U) is an environmental radioelement emitting alpha-particles and a heavy metal naturally present in groundwater which is consequently found in small proportions in food and drinking-water. The mean concentration of U in drinking water is 0,4 µg/L but with high disparity among areas such as reported in private drill wells in Canada (700µg/L (Moss 1983)) or in Finland (20 mg/L (Juntunen 1991; Salonen 1994)).

Uranium has 23 radioactive isotopes but  $^{238}\text{U}$ ,  $^{235}\text{U}$  and  $^{234}\text{U}$  are the main components of natural uranium (NU) (Priest 2001). This radioelement has civilian (mining, milling, fuel production, reactors and re-processing) and military applications that can increase the risk of exposure and toxicity (Bleise et al. 2003). U is well known for its use in nuclear power plants and nuclear weapons according to the fissile properties of  $^{235}\text{U}$  isotope. Enriched uranium (EU) is produced by increasing the amount of this isotope. During this process a by-product, called depleted U (DU) is generated and was used in heavy tank armor, armor penetrating bullets and civilian irradiation protection shields because of its high density and pyrophoricity. It has only 60% of natural U radioactivity but conserves all its chemical properties.

Depending on its solubility, route and duration of exposure, U can affect the lungs, bones, etc. but as a result of its filtration and retention the kidney is the main organ damaged by U toxicity. Indeed, exposure to U induces renal damages associated with renal impairments in animals (Banday et al. 2008; Gilman et al. 1998; Gueguen and Rouas 2012; Haley et al. 1982; Ortega et al. 1989; Zhu et al. 2009) and humans (Kurttio et al. 2006; Thun et al. 1985; Zamora et al. 1998). Several acute intoxications were reported after professional accidents in which workers were exposed to U through inhalation (Vicente-Vicente et al. 2010). As a consequence, acute nephrotoxicity was observed, with a decrease in the glomerular filtration rate (GFR) (Kathren and Moore 1986; Tanigawara et al. 1990), an increase in plasma creatinine levels (Pavlakis et al. 1996) and proteinuria (Lu and Zhao 1990). After ingestion or inhalation of U compounds, kidney damages have been consistently observed contrary to other health effects such as neurobehavioral changes or reproductive function.

U has on one hand a chemical toxicity and on the other hand a radiotoxicity depending on its isotopic composition (Gueguen et al. 2017; Miller 2007; UNSCEAR 2016; Vicente-Vicente et al. 2010). The chemical toxicity of U is primarily associated with kidney damage due to soluble compounds whereas the radiological toxicity is mainly described on the respiratory tract after exposure to less soluble compounds (ATSDR 2013a). Overall, U toxicity depends on sex, age, and species but more specifically on the route of exposure, its speciation and then the solubility of U compounds. Chimio- and radio-toxicity might cooperate after intake complicating the understanding of its mechanism(s) of action.

U (nephro-)toxicity is reported in many studies including recent reviews (Arzuaga et al. 2010; Asic et al. 2017; Faa et al. 2018; Gueguen et al. 2017; Vicente-Vicente et al. 2010; Yue et al. 2018). But still, the mechanisms involved, and the cellular and molecular pathways responsible for this toxicity have not been fully elucidated and not yet presented reliable to demonstrate its mechanism(s) of action leading to kidney impairment. This review is the first to propose an Adverse Outcome Pathway (AOP)





for U nephrotoxicity based on experimental and epidemiological data. The recent knowledge brought through this review will allow having a better classification and prediction of U nephrotoxicity and will help to target trails that must be developed in future mechanistic and toxicological research, hazard identification and risk assessment.

The chapters developed hereafter will follow the AOP approach for U-induced kidney defects, as shown in figure 1: from the exposure sources (anthropogenic/natural, chemical/physical forms, isotopic composition), their routes of exposure (inhalation, ingestion, skin) and tissue/cell distribution (absorption, glomerular filtration, cell passage), the identified molecular pathways (molecular initiating and key events), and the cellular and tissue response (DNA damage, inflammatory response, apoptosis) that leads to adverse kidney effects (renal impairment, carcinogenesis).

## I. Physico-chemical forms of uranium

U can be found in the environment with several chemical forms (oxides, chlorides, fluorides, nitrides...) and with various isotopic compositions (natural, depleted, and enriched). They are the first factors that influence the toxicity and adverse effects of U. U belongs to actinide family and exhibits a range of oxidation from +III to +VI in aqueous solution. The latter is the preferentially found valence for U, and can form complexes through the uranyl ion form  $\text{UO}_2^{2+}$ .

U absorption by the organism depends on its route of exposure, the pH and on its solubility (Carriere et al. 2004; Goldman et al. 2006; Milgram et al. 2008; Mirto et al. 1999a; Mirto et al. 1999b; Muller et al. 2006). The more water-soluble compounds (uranyl nitrate, U hexafluoride and U tetrachloride) were more potent systemic toxicants than poorly water-soluble compounds (U tetrafluoride, sodium diuranate and ammonium diuranate), whereas insoluble compounds (U trioxide or dioxide) have a much lower potential to cause systemic toxicity (Ansoborlo et al. 2006; Karpas et al. 1998; Leggett and Harrison 1995; Wrenn et al. 1985). The cytotoxic fraction of U is a phosphate complex of uranyl ( $\text{UO}_2(\text{PO}_4)^-$  and  $\text{UO}_2(\text{HPO}_4)_{\text{aq}}$ ), as shown on rat kidney proximal epithelial cells NRK-52<sup>E</sup>, (Carriere 2005; Muller et al. 2006).

In function of its cellular localization, U can be found in different forms: electron-dense precipitates or soluble. Indeed, U precipitates have been identified as U-phosphate thanks to extended X-ray absorption structure spectroscopy technology, and intracellular form of soluble U is U-carbonate. It seems that U carbonate complexes are internalized in cells and then, are in part metabolized into U-phosphate if U reaches the lysosomes where the low pH induces the change of U-carbonate into U-phosphate (Carriere et al. 2008).

## II. Entry of uranium in the organism and the cell

### Absorption of uranium into the organism

U has three major routes of contamination: ingestion, inhalation and subcutaneous lesion (ATSDR 2013a; Craft et al. 2004). For the general public population, ingestion is the most common way for U to penetrate the organism because of its natural or polluted presence in the environment and



therefore in food and water. Inhalation is a specific route of exposure for occupational exposure of workers and soldiers. Small particles of dust charged in U can pass through the respiratory system, reach the blood stream (Ubios et al. 1997) and then the kidneys where it accumulates. U can also reach the blood stream because of skin injury (Petitot et al. 2007; Tymen et al. 2000; Ubios et al. 1997). Whatever the route of exposure, U accumulates preferentially in the skeleton and in the kidneys (Diamond et al. 1989; La Touche et al. 1987; Leggett and Pellmar 2003; Paquet et al. 2006).

### **Tissue distribution and reabsorption of uranium in the kidney**

After ingestion, U uptake ranges between 0.1 to 2%, depending on the species and the solubility (Frelon et al. 2005; Konietzka 2015; La Touche et al. 1987; Wrenn et al. 1985). The major fraction of U is excreted in urines and faeces.

Once in the blood stream, U (VI) combines with bicarbonate, citrate and serum proteins. It is filtered with water through the glomerular membrane of the kidneys, concentrated in cortical and juxtaglomerular areas and bound to brush border membrane of the proximal convoluted tubules (PCTs) (Leggett 1989; Morrow et al. 1982; UNSCEAR 2016). Albumin, IgG, apolipoprotein A1, alpha1-acid glycoprotein, alpha-2 macroglobulin, haptoglobin, transferrin and fetuin-A are among those serum proteins with high affinity for U (VI), but Fetuin-A is reported to have the higher affinity despite its low concentration in serum (Ansoborlo et al. 2006; Basset et al. 2013; Cooper et al. 1982).

Precise distribution of U in the rat kidney tissue has been determined using microbeam scanning particle-induced X-ray emission (micro-PIXE), synchrotron radiation X-ray fluorescence (SR-XRF), micro-X-ray absorption fine-structure (micro-XAFS), and secondary ion mass spectrometry (SIMS), confirming that U distributes mainly in the PCTs of the inner zone of the cortex and in the outer stripe of the medulla (Homma-Takeda et al. 2015; Homma-Takeda et al. 2009; Kitahara et al. 2017; Poisson et al. 2014; Tessier et al. 2012). SR-XRF and micro-XAFS allow to show that U(VI) (uranyl ions  $UO_2^{2+}$ ) complexes with phosphates and carbonates in the kidney and could partially replace calcium in phosphate complexes. SIMS and micro-PIXE imaging clearly identified glomerulus, TCD and TCP and sub-cellular localization of U in epithelial cells. U-distribution in the kidney depends on the time of exposure. Indeed, after chronic exposure it has been shown thanks to SIMS imaging that U accumulated mainly in the PCTs after 12 months, but after 18 months the radioelement is detected in all the segments of the nephron including the glomerulus (Tessier et al. 2012).

### **Cellular distribution in the kidney**

U uptake by renal proximal tubular epithelial cells can occur through active or passive mechanisms. Interestingly, transmission electronic microscopy analysis of kidney cells have shown that U is taken up by endocytosis through binding to membrane phospholipids or proteins (Ghadially et al. 1982; L'Azou et al. 2002; Leggett 1989; Mirto et al. 1999b) and these results have been confirmed by the existence of a significant correlation between absorptive-mediated endocytosis and U uptake in cells (Muller 2008). These authors have shown that sodium-dependent phosphate co-transporter (NaPi-IIa) was also partly involved. An overexpression of NaPi-IIa in proximal tubule cell line increases U toxicity, whereas inhibiting this co-transporter reduces U toxicity (Muller et al. 2006).

Using SIMS technology or differential centrifugation associated with inductively coupled plasma mass spectrometry measurement, it has been shown that U can enter cells very rapidly (less than 15



minutes) and probably through passive diffusion of soluble forms (Gueguen et al. 2015; Suhard et al. 2018b; Yellowhair et al. 2018). At subtoxic concentrations (<100µM), soluble U localizes mainly in the nucleus, before it precipitates around the cells. U also localizes in the perinuclear regions of the cytoplasm, from one hour after treatment to 7-day continuous exposure (Carmona et al. 2018; Gueguen et al. 2015; Reisser-Rubrecht et al. 2008; Rouas et al. 2010; Suhard et al. 2018a). This nucleus and cytoplasmic distribution was also observed in rodents exposed to U *via* intra-peritoneal (IP) injection or ingestion of contaminated water (Homma-Takeda et al. 2015; Poisson et al. 2014).

### III. Molecular Initiating Events (MIEs)

The U binding to cell proteins, lipids or nucleic acid is probably the molecular initiating event(s) that will explain its cellular localization in various compartments (cytoplasm, nucleus, mitochondria) and then lead to adverse effects.

#### U binding to cytoplasmic or nucleus components

Depending on its chemical properties, U can directly bind and react with cytoplasmic proteins involved in the mechanisms responsible for cellular integrity, such as apoptosis, inflammation, protein folding in endoplasmic reticulum (ER) and DNA replication and repair. Indeed, uranyl can bind heat shock protein 90-alpha or the ERO1-like protein alpha from HK-2 cell extracts (Dedieu et al. 2009), whereas *in silico* studies have shown that  $UO_2^{2+}$  is a potent ligand of C-reactive protein (CRP), fucose binding lectin II, or mannose-binding protein C, involved in inflammation (Basset et al. 2013; Pible et al. 2010). The calcium-binding areas of the CRP protein would be the main sites of  $UO_2^{2+}$  binding, preventing dead cell recognition by CRP protein in presence of  $UO_2^{2+}$ .

Once in the nucleus, U can cause DNA damages through two mechanisms: direct interactions with DNA, or indirectly, through free radical generation. In the first case, uranyl cations interact directly with the negatively charged DNA phosphate backbone and in the second case U causes DNA damages by free radical generation with Fenton type chemistry (Yazzie et al. 2003). Some studies showed that uranyl ions were able to bind nucleic acid phosphate groups of DNA and RNA (Ansoborlo et al. 2006; Dedieu et al. 2009; Huxley and Zubay 1961; Wu et al. 1996). Uranyl ions  $UO_2^{2+}$  were able to bind DNA and form DU-phosphodiester moiety in the minor grooves of DNA, more specifically in the N3 position of adenine (Nielsen et al. 1992). The direct interaction of U with DNA induces adduct formation in a dose- and time- dependent (Stearns et al. 2005; Yellowhair et al. 2018). When uranyl ions bind nucleic acid phosphate groups of DNA, this could lead to a spatial congestion of the strand and trigger inhibition of DNA repair mechanisms, as shown with uranyl acetate preventing connection of DNA-binding proteins to DNA (Hartsock et al. 2007). Moreover, the formation of uranyl-DNA adducts may act as an upstream lesion leading to strand breaks, abasic sites, or possibly DNA cross-links (Wilson et al. 2014), as described in a further section.

Zinc finger proteins are involved in DNA repair, with a zinc ion coordinated by cysteine and histidine. Cooper *et al.* showed that U was able to significantly disrupt zinc finger function and increase DNA damage at concentrations 10-fold lower than required to detect minimal cytotoxicity in a same cell system (Cooper et al. 2016), such as reported for other carcinogenic or co-carcinogenic metals like arsenic (Beyersmann and Hartwig 2008; Ding et al. 2009; Hartwig 2013a, b; Sun et al. 2014b; Zhou et al. 2015). Proteomics analysis of U-interacting proteins identified the poly [ADP-ribose] polymerase 1



(PARP-1) as a candidate for U-binding in kidney cells (Dedieu et al. 2009), and it has been shown that U inhibits DNA binding of certain transcription factors including the C2H2 zinc finger proteins Sp1 and Aart (Hartsock et al. 2007). U inhibits PARP-1 activity and causes zinc loss from the protein in a non-selective way. Indeed, this loss happens in all three zinc finger configurations C2H2, C3H1 and C4ZF implied in DNA repair pathways (Cooper et al. 2016). There are also evidences that U can inhibit non-zinc finger DNA binding proteins (Hartsock et al. 2007).

## Mitochondrial disruption

The mitochondria is the main source of energy of the cell, providing 90% of the cellular adenosine triphosphate (ATP), and it is also well known that it plays a significant role in apoptosis and necrosis. Indeed, mitochondrial dysfunction can lead to oxidative stress and cell death, resulting in tissue damage.

The formation of reactive oxygen species (ROS) by U through a Fenton-type reaction could cause a lipid peroxidation and then a mitochondrial membrane potential (MMP) collapse, as shown in isolated mitochondria from UA-treated rat kidney (Shaki et al. 2012; Shaki and Pourahmad 2013) and in kidney cells after DU treatment *in vitro* (Hao et al. 2014; Thiebault et al. 2007). This phenomenon has also been reported in primary rat hepatocytes (Pourahmad et al. 2006). Accordingly, U triggers disruption of mitochondrial outer membrane integrity and mitochondrial swelling in a concentration- and time-dependent manner, which is an indicator of MMP collapse (Shaki et al. 2012; Shaki and Pourahmad 2013). Indeed, Pourahmad *et al.* also report that collapse of the MMP triggers the opening of the mitochondrial permeability transition pore (Pourahmad et al. 2006). As a consequence, U induces decline of ATP/ADP ratio in isolated kidney mitochondria, through a decrease in the ability of oxidative phosphorylation for ATP production (Shaki et al. 2012; Shaki and Pourahmad 2013). Uranyl ions interfere with the complexe of cytochromes (cyt) cyt b5-cyt c and this interaction is due to the presence of acidic residues and the highly negatively charged heme-binding domain of cyt b5 (Sun et al. 2014a; Wan et al. 2012). The formation of this cyt b5-cyt c complex is known to play an essential role in the initiation of apoptosis (Ren et al. 2004).

Shaki *et al.* demonstrated that the rate of succinate (complex III substrate)-supported mitochondrial hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) production is significantly increased after U treatment in isolated kidney mitochondria. This team also demonstrated that U alters the function of the mitochondrial complex II. Therefore, U can disrupt the electron transfer chain, mainly at complexes II and III (Shaki et al. 2012; Shaki and Pourahmad 2013).

U mechanisms of action on kidney mitochondria described in this chapter represent one of the molecular initiating events explaining U nephrotoxicity. These phenomena have also been demonstrated in other organs such as the liver (Pourahmad et al. 2006; Pourahmad et al. 2011) and the brain (Shaki et al. 2013).

## IV. Molecular key events (MKEs)

The effects of U on mitochondria function, DNA conformation change or protein folding can lead to molecular key events, including Nrf2-pro/antioxidant, DNA damage repair (DDR), pro/anti-apoptotic and pro/anti-inflammatory pathways.





## The Nrf2 pathway

Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) is a key transcription factor playing a role in the up-regulation of anti-oxidative enzymes responsible for the synthesis of glutathione and direct-acting antioxidant molecules.

It is often reported that the cytotoxicity of U passes through the formation of ROS and oxidative stress in the kidney (Pourahmad et al. 2006; Vicente-Vicente et al. 2010). This could be mainly due to the inhibition of Nrf2 nuclear translocation, as shown in rats injected with 5 mg/kg (Zheng et al. 2015). This hypothesis is supported by *in vitro* studies showing a decrease in Nrf2 protein expression, nuclear translocation and accumulation in rat kidney cells NRK-52E treated with 400 and 800  $\mu$ M of U for 24 hours (Yi et al. 2018; Yuan et al. 2016). This phenomenon triggers the down-regulation of the down-stream antioxidative response element (ARE)-driven target genes of Nrf2, such as the antioxidant and phase II detoxifying enzymes heme oxygenase 1 (HO-1), NAD(P)H quinone dehydrogenase 1 (NQO-1), glutamate-cysteine ligase catalytic subunit (GCLC), and thioredoxin reductase 1 (TXNRD-1).

Interestingly, U injected in rats diminished the expression levels of cystathionine  $\beta$ -synthase (CBS) and cystathionine  $\gamma$ -lyase (CSE), which are enzymes catalyzing the endogenous formation of hydrogen sulfide ( $H_2S$ ) (Yuan et al. 2016; Zheng et al. 2015).  $H_2S$  is an endogenous signaling gasotransmitter regulating antioxidative, anti-inflammatory and cytoprotective responses (Kimura et al. 2012). The results obtained by Zheng *et al.* (2015) indicate that the decrease  $H_2S$  renal concentration triggers an alteration in the Nrf2 pathway leading to a decrease in antioxidative enzyme activities (Zheng et al. 2015). Indeed, a drug-induced  $H_2S$  in kidney cells or in rats treated with U reestablished the Nrf2 pathway and suppresses the oxidative stress due to U treatment (Yi et al. 2018; Yuan et al. 2016; Zheng et al. 2015). Yuan *et al.* also showed that the U-induced inhibition of Nrf2 triggers the down-expression of CBS and CSE, leading to a loop with the decrease of endogenous  $H_2S$ , leading back then to the inhibition of Nrf2 (Yuan et al. 2016). Indeed, *in vitro* studies have shown that CBS and CSE expressions could be regulated by the nuclear transcription factor Nrf2 (Hourihan et al. 2013; Li et al. 2011). Zheng *et al.* hypothesized that U-induced decrease of Nrf2 nuclear expression would be due to the inhibition of the upstream regulator protein kinase B (Akt) and glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3 $\beta$ ) activities, increasing the nuclear expression of the tyrosine-protein kinase Fyn (Zheng et al. 2015). The nuclear overexpression of Fyn down-regulates Nrf2 and therefore triggers the inhibition of the transcription of antioxidant enzymes, leading to oxidative stress in the kidney cells.

Furthermore, Yi *et al.* demonstrated that U induced NADPH oxidase 4 (Nox4) in primary rat hepatocytes, triggering the phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) and the release of cytochrome c. Indeed, the use of a chemical inhibitor of Nox4 totally inhibited the phosphorylation of p38 MAPK and decreased the ROS formation induced by U in the cells, confirming this pathway is involved in U cytotoxicity (Yi et al. 2019).

## DNA damages

To this day, the majority of studies dealing with U genotoxicity showed that the DNA damages induced in kidney cells following U exposure can be assigned to U chemical toxicity rather than its radioactivity (Asic et al. 2017). Nevertheless, Miller et al. looked for radiation-induced mutations



after DU exposure using the same concentrations of two uranyl nitrate compounds with different U isotopic concentrations. They showed that DU was more harmful when composed with higher amounts of  $^{235}\text{U}$  isotope, triggering increased *hprt* mutant frequency (Miller 2007; Miller et al. 2002b).

Guanosine is the ribonucleoside with the lowest redox potential (Steenken and Jovanovic 1997), and thus guanine is an electron donor for uranyl ions. Therefore, the resulting guanine cation can go through the DNA strand, moving from DNA guanines to others. This process triggers the guanine residues oxidation and is one of the mechanisms of 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) formation, a commonly used marker of oxidative stress-derived DNA damage, by U (Smirnova et al. 2005). 8-OHdG can also be directly generated by ROS, resulting from hydrogen peroxide exchanging electrons with uranyl ions (Hamilton et al. 1997; Hawkins and Davies 2001) and can cause oxidative damage to DNA in HEp-2 cells (Garmash et al. 2014). U can induce 8-OHdG in a dose- and time-dependent manner *in vitro* and be partly inhibited by antioxidant enzyme superoxide dismutase (SOD) (Miller et al. 2002a).

### **DNA damage response pathway**

Both DNA double-strand break (DSB) repair mechanisms: homologous recombination (HR) and non-homologous end-joining (NHEJ), can be affected by U treatment, starting at the low concentration of 10  $\mu\text{M}$ , 24 hours after treatment in bronchial epithelial cell line BEP2D (Jin et al. 2017). This is due to inhibition in critical DDR proteins such as ATM, BRCA1, RPA80, and EXO1 (HR mechanism) and DNA-PKcs and 53BP1 proteins (NHEJ pathway) and ultimately leads to dose-dependent accumulation of nuclear DSBs, as shown with  $\gamma\text{-H2AX}$  (Jin et al. 2017). In zebrafish model, the DNA-PK kinase activity is also altered by the presence of U (Pereira et al. 2012).

Interestingly, Yellowhair *et al.* showed that deficiency in base / nucleotide excision repair (BER and NER) mechanisms was directly related to U-induced cytotoxicity *in vitro* (Yellowhair et al. 2018). Indeed, EM9 CHO cell line deficient in BER was more potent to U cytotoxicity than H9T3 cell line cloned with the XRCC1 gene, a gene involved in the BER mechanism. In a same way, UV5 CHO cell line deficient in NER was more potent to U cytotoxicity than the complemented 5T4-12 cell line cloned with the ERCC2 gene, a gene involved in the NER mechanism. These results imply that DNA BER and NER pathways are involved in the response to U, and directly correlated with U-induced DNA damages (Yellowhair et al. 2018).

As explained on MIE section, U can cause DNA damages by directly interacting with DNA or DNA proteins or indirectly through ROS release due to its physico-chemical properties. As shown by Yellowhair *et al.*, DNA damages and DDR deficiency can at least partly explain U-induced genotoxicity and cytotoxicity developed in further section (Yellowhair et al. 2018).

### **Pro- and anti- apoptotic pathways**

*In vivo*, the induction of signaling pathways implied in cell survival or apoptosis by U is probably due to ROS release and mitochondrial disruption. The decrease of the MMP is an upstream event of mitochondrial apoptosis, and Thiébault *et al.* have identified this correlation in normal rat proximal kidney cells NRK-52<sup>E</sup>, showing the peak of apoptosis was reached during MMP is at its minimum (with a decrease by a factor 60 compared to controls) (Thiebault et al. 2007).



### **PI-3K pathway**

A single injection of 2 or 4 mg/kg uranyl nitrate induces pro-survival Akt pathway in the kidney of Swiss albino mice. The pro-survival signaling molecule extracellular signal-regulated kinase (ERK) is increased, 3 days after U injection. This activation is followed by a transient elevation of phosphorylated Akt levels 7 days after treatment (Sangeetha Vijayan et al. 2019), whereas a decrease in Akt phosphorylation probably occurs at short-term, as shown after 18 hours of exposure to uranyl acetate in NRK-52<sup>E</sup> kidney cells (Yi et al. 2018). However, Sangeetha *et al.* showed that the activation of the pro-apoptotic c-Jun N-terminal kinase (JNK) was induced by IP injection of uranyl nitrate, with a peak of activation 72 hours after treatment, suggesting it would be partly responsible for U-induced apoptosis. These results are in accordance with *in vitro* studies (Hao et al. 2016b) and with results found in other organs, such as in rat hepatocytes (Yuan et al. 2017), showing that the activation of JNK, through its phosphorylation, is partly responsible for U-induced apoptosis.

Interestingly these molecular pathways are also known to be involved in the cellular response to inflammation, and may also be triggered by U through inflammation receptors such as the toll-like receptor (TLR), tumor necrosis factor receptor (TNFR) and interleukin receptor (ILR) (Sangeetha Vijayan et al. 2019).

### **MAPK pathway**

DU-induced apoptosis could be caused by the increase of p38-MAPK phosphorylation and activation, leading to modifications of the release of cyt-c, causing caspase-3 activation and finally apoptosis (Hao et al. 2016b). Indeed, U increases the translocation of cyt-c from the mitochondria to the cytosolic fraction of isolated rat kidney mitochondria (Shaki et al. 2012; Shaki and Pourahmad 2013) and in human kidney cells (Hao et al. 2014). Moreover, U triggers the cytoplasmic concentration of the apoptosis-inhibitor factor (AIF) in kidney cells (Hao et al. 2014) which can lead to both caspase-dependent and caspase-independent apoptotic pathways (Cande et al. 2004). U-induced apoptosis may also be triggered by the inhibition of the anti-apoptotic protein ethylmalonic encephalopathy 1 (ETHE1) enzyme, a mitochondrial sulfur dioxygenase that can translocate to the cytoplasm to inhibit p53-induced apoptosis (Hao et al. 2016a).

### **Bax/Bcl2 pathway**

The mitochondrial disruption induced by U has been also related to the regulation of the anti- and pro- apoptotic factors B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) and Bcl-2 associated X protein (Hallum et al.). U induces a decrease of the protein BCL-2 mitochondrial expression, whereas it induces an overexpression of Bax protein in HK-2 cells treated with 500  $\mu$ M of DU for 24 hours (Hao et al. 2014). These molecular key events of apoptosis have also been identified *in vivo* in the kidneys of mice treated with a single dose of 10 mg/kg U, 4 days after IP injection (Hao et al. 2015).

### **FasR/FasL pathway**

The FasR pathway is also induced by DU *in vitro* as the level of sFasL is increased by 400% after 500  $\mu$ M treatment in HK-2 cells, confirming the FasR/caspase-8 pathway is implied in U apoptotic effect in the kidney too (Hao et al. 2014). Thus, both the mitochondrial pathway and Fas receptor (FasR)-mediated pathway are involved in DU-induced apoptosis, 24 hours after treatment in HK-2 cells.



## Autophagy

Autophagy is a cell cleaning process, induced by starvation or stressful conditions, that promotes cell survival through recycle of damaged proteins and organelles. U is able to trigger autophagy rapidly in osteoblastic and osteocytic cells through the upregulation of microtubule-associated protein 1 light chain 3 protein LC3-II protein level, a marker of autophagosome formation (Hurault et al. 2019; Pierrefite-Carle et al. 2016). Yet an inhibition of the autophagic flux is observed 24 hours after treatment in the UMR-106 osteoblastic cell line. As a whole, these results indicate that U can perturb osteoblast and osteocyte mineralization capacity.

To our knowledge, no article showing autophagy induction by U in the kidney has been published to this day. Nevertheless, a recent but not yet published work done in our laboratory (Bontemps *et al.*) reveals that a single IP injection of 5 mg/kg DU was able to induce the formation autophagosomes in mice kidneys.

## Pro-inflammatory signals and NF- $\kappa$ B pathway

Gazin *et al.* demonstrated that the secretion of TNF- $\alpha$  was due to U-induced activation of JNK and p38-MAPK signaling pathways (Gazin et al. 2004). Interestingly, both JNK and p38-MAPK signaling pathways were also partly responsible for U-induced apoptosis, suggesting crosstalks may occur in U-induced mechanisms of toxicity.

The nuclear transcription factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- $\kappa$ B) is a critical mediator of the cellular responses to inflammation, oxidative stress, and cell survival. In the kidneys of rats injected with single dose of 2.5, 5 and 10 mg/kg of uranyl acetate, there is an activation of NF- $\kappa$ B and phosphorylated I $\kappa$ B (Zheng et al. 2015). U decreases endogenous H<sub>2</sub>S formation (Yuan et al. 2016; Zheng et al. 2015), an endogenous gas exerting anti-oxidative, anti-inflammatory and cytoprotective effect in the kidneys. NaHS treatment, along with U contamination, prevents the NF- $\kappa$ B/p65 nuclear translocation in renal cells thus inhibiting the protein expression of NF- $\kappa$ B-activated inflammatory genes, including TNF- $\alpha$ , nitric oxide synthase (iNOS), and cyclooxygenase (COX-2). These results indicate that U induces inflammation by the activation of NF- $\kappa$ B pathway, probably as a consequence of endogenous H<sub>2</sub>S decrease. ETHE1, a mitochondrial enzyme catabolizing H<sub>2</sub>S, was shown to be altered by uranium (Hao et al. 2016a) and thus could initiate this pathway.

## Endoplasmic reticulum stress signals

U-induced ER stress would be partly due to the inhibition of Nrf2 activity (Yi et al. 2018). In rat kidney proximal cells NRK-52<sup>E</sup>, Nrf2 induces the expression of the proteasome subunit alpha type-6 (PSMA6) and beta type-7 (PSMB7) which both contribute to the complete assembly of 20S proteasome complex. As previously described, U reduces Nrf2 nuclear translocation, and therefore reduces the formation of the 20S proteasome complex, leading to ER stress in kidney cells. Moreover, U significantly increases the expression of GRP78, also known as the binding immunoglobulin protein, and CHOP, known as the CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein (Yi et al. 2018). They are respectively induced by the activating transcription factor 6 (ATF6) and protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) ER stress pathways. At a cellular level, a long term ER stress can lead to apoptosis and cell death through the activation of CHOP and GRP78.





## V. Cellular key events

### Oxidative stress

The ROS production due to U exposure is described as a MKE through Fenton type reaction and the formation of DNA adducts, lipid peroxidation (MDA and TBARs formation) from *in vitro* or *in vivo* experiments (Hao et al. 2012; Pourahmad et al. 2006; Shaki et al. 2012; Shaki and Pourahmad 2013; Yi et al. 2019; Yuan et al. 2017; Zheng et al. 2015).

As a consequence the levels of glutathione, a well-known antioxidant defense factor against ROS, decreased in a dose-dependent manner after uranyl acetate treatment in isolated rat kidney mitochondria, (Shaki et al. 2012; Shaki and Pourahmad 2013), and more globally in kidney cells (Hao et al. 2015; Hao et al. 2014; Yuan et al. 2016; Zheng et al. 2015). Moreover, the catalase (CAT) protein expression, an antioxidative enzyme, decreases *in vitro* 24 hours after U treatment in HK-2 and NRK-52<sup>E</sup> cells (Hao et al. 2014; Yuan et al. 2016), and *in vivo* in rat kidneys (Hao et al. 2015; Hao et al. 2012; Zheng et al. 2015). Thereby, the decrease of CAT activity is exacerbated by the lower SOD expression in mouse kidneys (Hao et al. 2015; Hao et al. 2016a; Yuan et al. 2016; Zheng et al. 2015), an enzyme known to trigger CAT activity and antioxidative response. Chronic oxidative stress could be an important contributor of chronic renal dysfunction or kidney carcinogenesis induced by U.

### DNA damages and genotoxicity

U has been shown to cause DNA damage and mutations in cells (Stearns et al., 2005) (Coryell and Stearns 2006; Knobel et al. 2006; Stearns et al. 2005), probably through the alteration of the DDR pathways. The DNA damages induced by U seem to be aggravated in presence of vitamin C (Wilson et al. 2014; Wilson et al. 2015). Whereas the damages are reversible at low concentrations, the DNA alterations become irreversible and lead to cell death at higher concentrations of U (Thiebault et al. 2007).

#### DNA strand breaks

U has been identified to cause both single strand breaks (SSB) and DSB *in vitro*. As explained above in the MIE section, number of studies implies the genotoxicity of U through a free radical production., even though DNA strand breaks could also be caused by a direct binding of U to negatively charged phosphate backbone of DNA leading to the formation of DNA adducts (Asic et al. 2017; Hamilton et al. 1997; Miller et al. 2002a; Periyakaruppan et al. 2007; Yazzie et al. 2003; Yellowhair et al. 2018).

By studying  $\gamma$ -H<sub>2</sub>AX foci and thanks to the comet assay, it has been shown that U induces DSBs in a dose-dependent manner 24 hours after treatment in kidney cell (Thiebault et al. 2007) or in human bronchial epithelial cell line BEP2D (Jin et al. 2017). In rats exposed to U through inhalation, DNA strand breaks are induced in kidney and in broncho-alveolar lavage (BAL) cells (Monleau et al. 2006a; Monleau et al. 2006b). Comet assay revealed that DNA damages in BAL cells were partly composed by DSBs, reinforcing the hypothesis of the U-alpha radiation contribution to its genotoxic effects *in vivo* (Monleau et al. 2006b) or *in vitro* (Miller 2007; Miller et al. 2002b).



### **Chromosomal aberrations and micronuclei formation**

U has mutagenic properties and can induce disruption or breakages of chromosomes, thus making this radioelement classified as a clastogen (LaCerte et al. 2010; Wise et al. 2007). U is also aneugen, causing an abnormal number of chromosomes (Miller 2006; Nriagu et al. 2012). These *in vitro* studies show that U could act as a cell proliferation suppressor, inducing elevated micronuclei, chromosomal aberrations and lesions in CHO cells and in human bronchial fibroblasts (Holmes et al. 2014; Lin et al. 1993; Wise et al. 2007). Other studies have shown that U causes genomic instability and gene mutations (Miller 2007), increasing death rate in human immortalized osteoblasts (Miller et al. 2003). But still, the formation of micronuclei hasn't been found yet in normal rat kidney cells NRK-52<sup>E</sup>, even after U treatments going up to 600 µM (Thiebault et al. 2007).

Populations living in U-contaminated areas have an increased number of chromosome aberrations and lesions, correlated with U-exposure (Fister and Jovic 2014; Ibrulj et al. 2007; Milacic and Simic 2009).

### **Death mechanisms**

U-induced cell death can be caused by both apoptosis, triggered by increased effector caspase 3/7 activity, and by necrosis, reflected by the increased level of LDH in the cell supernatant that follows exposure. U-induced apoptosis has been observed in many models from *in vitro* and *in vivo* studies, in different organs and cells (Angenard et al. 2011; Gueguen et al. 2015; Kalinich et al. 2002; Pourahmad et al. 2006; Prat et al. 2005; Rouas et al. 2010; Shaki et al. 2012). This apoptotic activity is often attributed to lysosomal or mitochondrial alterations and increased ROS production (Pourahmad et al. 2006; Shaki et al. 2012; Thiebault et al. 2007). Oxidative stress and DNA damages induced by U exposure can trigger cytotoxicity once the cellular mechanisms of protection are overwhelmed. *In vitro*, U exposure induces a decrease of viability in kidney cells, as revealed by increased LDH and NAG concentrations (Hao et al. 2014; Yuan et al. 2016). *In vivo*, U-induced apoptosis (TUNEL-positive nuclei) has been confirmed in male Swiss albino mice kidney cells, after 2 and 4 mg/kg IP injection of U starting from 72 hours after treatment and until 14 days after treatment (Sangeetha Vijayan et al. 2019). Indeed, the apoptosis effectors caspases 3/7 expression and activity are induced in the kidney of rodents treated with a single IP injection, starting at 2 mg/kg U (Bontemps et al. 2019; Hao et al. 2015).

Interestingly, U induces the activation of both caspase-3 and caspase-9 in normal rat kidney cells NRK-52<sup>E</sup> (Thiebault et al. 2007; Yi et al. 2018), whereas it triggers the activation of caspase-8, caspase-9 and caspase-3 in human kidney HK-2 cells (Hao et al. 2014). The caspase-3 activation through caspase-9 reveals a mitochondrial pathway of apoptosis whereas the activation of caspase-3 through caspase-8 reveals a non-mitochondrial pathway of apoptosis, as reported in previous section. The induction of pro-apoptotic proteins can be triggered by the induction of ROS and ER stress, as it has been described in the sections above. Indeed, Yi *et al.* have shown that U induces ER stress in kidney cells, leading to the activation of caspase-12 and caspase-3 within 18 hours (Yi et al. 2018).



## Inflammation

Inflammation is a known mechanism of U nephrotoxicity (Hao et al. 2013; Taulan et al. 2006; Zheng et al. 2015). Exposures to U have revealed a modulation in the production and secretion of inflammatory cytokines (Monleau et al. 2006b) in the kidney of mice injected with 5 mg/kg U, where some genes were overexpressed 48 hours after treatment such as the gene encoding GAL-3, a pro-inflammatory molecule (Taulan et al. 2006). Moreover, inflammatory upregulation of intercellular and vascular cell adhesion molecules (ICAM and VCAM), involved in the recruitment of inflammatory cells, were induced in the kidneys of mice treated with single injections of UN (Bontemps et al. 2019).

## VI. Adverse Outcome

It is well-known that U can induce tissue lesions in the kidney, the most sensitive organ to U intoxication (UNSCEAR 2016; Vicente-Vicente et al. 2010). Indeed, an injection of U induces tubular and glomerular damages, observable by histological analyses and starting from 0.1 mg/kg to 126 mg/kg U, beginning one hour after exposure in rodents (Blantz 1975; Diamond et al. 1989; Gueguen and Rouas 2012; Haley et al. 1982; UNSCEAR 2016; Vicente-Vicente et al. 2010). Renal tubular epithelial cell hyalinosis, cell vacuolization, cell shedding and necrosis and urinary casts were observable after U exposure in rodent kidneys. Still, the PCTs remain the main target of U-induced histological alterations (Bontemps et al. 2019; Haley 1982).

Epidemiological studies have also observed tubular damages in populations drinking water containing high concentrations of U (2 à 781 µg/L) showing renal glucosuria and calcium and phosphate urinary excretion. Yet, no modification was observed in creatinine clearance and urinary protein levels, indicating the lack of glomerular damages (Kurttio et al. 2002; Zamora et al. 1998). Zamora *et al.* (1998) observed an induction of alkaline phosphatase (ALP) and β2-microglobulin (B2MG) secretions, two biomarkers for renal adverse effects (Zamora et al. 1998). The secretion of B2MG was also induced in individuals drinking water contaminated with 0.2 to 470 µg/L and showing U urinary concentrations up to 8 times higher than normal, even if no nephrotoxicity has been observed (Selden et al. 2009). An increase in plasma creatinine levels and proteinuria has been reported in individuals exposed to U through inhalation after professional accidents (Vicente-Vicente et al. 2010). Gulf War veterans exposed to DU also showed increased urinary B2MG and retinol binding protein levels, which indicate PCT impairment (Arzuaga et al. 2010).

In experimental studies, exposures to U also trigger kidney parameters such as serum creatinine and blood ureic nitrogen (BUN) (Hao et al. 2015; Hao et al. 2012; Shaki et al. 2012). These changes indicate a renal impairment and a dysfunction of the filtration function of the kidney of rats receiving a single injection of uranyl acetate (Zheng et al. 2015). The renal impairment function is confirmed by the increased urinary levels of glucose, proteins, and electrolyte excretion (sodium, potassium, magnesium, calcium, and inorganic phosphate) in rodents (Banday et al. 2008; Bontemps et al. 2019; Haley et al. 1982; Sanchez et al. 2001; Taulan et al. 2006). Moreover, U induces a significant increase of urine volume, uric acid and NAG in rodents treated with U (Diamond et al. 1989; Fukuda et al. 2005; Sanchez et al. 2001; Zheng et al. 2015). During PCT injuries, sensitive biomarkers such as the transmembrane protein KIM-1 are overexpressed in the kidney (Bonventre 2009; Bonventre et al. 2010; Ko et al. 2010). In mice treated with a single IP injection of DU, KIM-1 gene and *in situ*



expressions are induced in the kidney, beginning at 2 mg/kg 72 hours after treatment, indicating PCT damages (Bontemps et al. 2019). This *in situ* overexpression of KIM-1 in the kidney has also been observed in rats, 48 hours after an injection of 4 mg/kg of uranyl acetate (Iwakura et al. 2016).

As seen above, U can modulate the immune and inflammatory response in the kidney. The overexpression of the CAMs in the kidney can result in the recruitment of inflammatory cells such as monocytes and macrophages in the renal interstitium of rats injected with toxic doses of UN (Bontemps et al. 2019; Sun et al. 2002). This is what is suggested by the results obtained after a follow-up study of 8 weeks after challenge in an acute-exposure rat model, where mononuclear infiltrations are observed in the renal tissue (Haley et al. 1982).

## **VII. Organism and population outcomes: chronic kidney disease and carcinogenesis**

In a general manner, the mechanisms of U nephrotoxicity described above (DNA damages, ROS production, inflammation and apoptosis) can lead to chronic kidney disease (CKD) (Aminzadeh and Vaziri 2012). In the specific case of U exposures, experimental studies have observed a link between U-induced ROS leading to oxidative stress and the ultrastructural changes and damages observed in the kidneys of rats exposed through drinking water (10-40mg/kg) (Linares et al. 2006). The tissue damages caused by acute exposures to U described above have been associated with a loss of renal function in the same *in vivo* model (Banday et al. 2008; Haley 1982). Renal failure, associated with U accumulation in the kidney, has also been detected after chronic exposures to U (Haley et al. 1982; Ortega et al. 1989; Zhu et al. 2009), and in individuals acutely exposed to U through inhalation, who had an increased GFR (Kathren and Moore 1986; Tanigawara et al. 1990). In human beings who presented high levels of U intakes, there were chemical changes in the PCTs, manifested by protein loss through urines, but these effects were only transitory and reversible (Priest 2001). Population chronically exposed to U in drinking water presented adverse renal effects, as shown by the increase of biomarkers of PCT damages, as described in the preceding section. These alterations of the PCTs in the kidney in populations overexposed to U can lead to tubular necrosis, as it has been the most relevant clinical consequence of U acute toxicity in humans (Briner 2010).

U carcinogenicity is described in several study depending on the route of exposure, the solubility of the compound but its definition as a carcinogen is still debated for the kidney (Asic et al. 2017; Cappello and Macario 2019). Carcinogenesis can be describe as a three step event (Cappello and Macario 2019).The initiation phase would be where U alters the DNA of kidney cells through direct and indirect mechanisms (Asic et al. 2017; Hamilton et al. 1997; Miller et al. 2002a; Periyakaruppan et al. 2007; Yazzie et al. 2003; Yellowhair et al. 2018), transforming them from normal to potentially tumoral. Then, as the DDR mechanisms are altered after U exposure, an accumulation of the nuclear DNA alterations probably occurs, giving them the possibility to proliferate (Holmes et al. 2014; Lin et al. 1993; Wise et al. 2007). Finally, U can directly interact with proteins involved in the immune response such as the CRP protein, or indirectly initiate and promote inflammation in the kidney, which could lead to the progression step.

Yet, epidemiological studies haven't shown a link between professional exposure to U and mortality caused by urogenital or renal disease in cohorts of workers (Boice et al. 2008; Checkoway et al. 1988;





Dupree et al. 1987; Lundin 1969; Polednak and Frome 1981). And even if acute exposures to U seem to induce nephrotoxicity, long-term studies haven't shown the induction of renal damages in global population (ATSDR 2013b; Eisenbud and Quigley 1956; Luessenhop et al. 1958) as in veterans or civilians exposed to DU during Gulf War (McDiarmid et al. 2004; McDiarmid et al. 2007; McDiarmid et al. 2006; McDiarmid et al. 2000).

## VIII. Conclusion

There are limited evidence of CKD induced by U in epidemiological studies (Weidemann et al. 2016) and U is a weak carcinogen by itself, but associated with other toxicant there may be a potentiation of its effects (Cappello and Macario 2019). That is why having a better understanding of its mechanisms of nephrotoxicity is essential to make a risk assessment for professional and global population. Based on an AOP approach, this review proposes a scheme (figure 2) of U toxicity in the kidney, and allows us to visualize the different steps leading from the molecular initiating events in the kidney cells, to the impairment and the dysfunction of the organ, potentially leading to CKD and cancer in individuals.

## Bibliography

- Aminzadeh MA, Vaziri ND (2012) Downregulation of the renal and hepatic hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S)-producing enzymes and capacity in chronic kidney disease. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 27:498-504
- Angenard G, Muczynski V, Coffigny H, Duquenne C, Frydman R, Habert R, Livera G, Rouiller-Fabre V (2011) In vitro effects of Uranium on human fetal germ cells. *Reprod Toxicol* 31:470-476
- Ansoborlo E, Prat O, Moisy P, Den Auwer C, Guilbaud P, Carriere M, Gouget B, Duffield J, Doizi D, Vercouter T, Moulin C, Moulin V (2006) Actinide speciation in relation to biological processes. *Biochimie* 88:1605-1618
- Arzuaga X, Rieth SH, Bathija A, Cooper GS (2010) Renal effects of exposure to natural and depleted uranium: a review of the epidemiologic and experimental data. *Journal of toxicology and environmental health Part B, Critical reviews* 13:527-545
- Asic A, Kurtovic-Kozaric A, Besic L, Mehinovic L, Hasic A, Kozaric M, Hukic M, Marjanovic D (2017) Chemical toxicity and radioactivity of depleted uranium: The evidence from in vivo and in vitro studies. *Environ Res* 156:665-673
- ATSDR (2013a) Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological profile for Uranium.
- ATSDR (2013b) Toxicological profile for uranium. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, Georgia, U.S.
- Banday AA, Priyamvada S, Farooq N, Yusufi AN, Khan F (2008) Effect of uranyl nitrate on enzymes of carbohydrate metabolism and brush border membrane in different kidney tissues. *Food Chem Toxicol* 46:2080-2088
- Basset C, Averseng O, Ferron PJ, Richaud N, Hagege A, Pible O, Vidaud C (2013) Revision of the biodistribution of uranyl in serum: is fetuin-A the major protein target? *Chemical research in toxicology* 26:645-653
- Beyersmann D, Hartwig A (2008) Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. *Arch Toxicol* 82:493-512
- Blantz RC (1975) The mechanism of acute renal failure after uranyl nitrate. *J Clin Invest* 55:621-635



Bleise A, Danesi PR, Burkart W (2003) Properties, use and health effects of depleted uranium (DU): a general overview. *J Environ Radioact* 64:93-112

Boice JD, Jr., Cohen SS, Mumma MT, Chadda B, Blot WJ (2008) A cohort study of uranium millers and miners of Grants, New Mexico, 1979-2005. *Journal of radiological protection : official journal of the Society for Radiological Protection* 28:303-325

Bontemps A, Conquet L, Elie C, Magneron V, Gloaguen C, Kereselidze D, Tack K, Barbier OC, Gueguen Y (2019) In Vivo Comparison of the Phenotypic Aspects and Molecular Mechanisms of Two Nephrotoxic Agents, Sodium Fluoride and Uranyl Nitrate. *International journal of environmental research and public health* 16

Bonventre JV (2009) Kidney injury molecule-1 (KIM-1): a urinary biomarker and much more. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 24:3265-3268

Bonventre JV, Vaidya VS, Schmouder R, Feig P, Dieterle F (2010) Next-generation biomarkers for detecting kidney toxicity. *Nature biotechnology* 28:436-440

Briner W (2010) The toxicity of depleted uranium. *International journal of environmental research and public health* 7:303-313

Cande C, Vahsen N, Garrido C, Kroemer G (2004) Apoptosis-inducing factor (AIF): caspase-independent after all. *Cell death and differentiation* 11:591-595

Cappello F, Macario AJL (2019) Depleted uranium induces human carcinogenesis involving the immune and chaperoning systems: Realities and working hypotheses. *Medical hypotheses* 124:26-30

Carmona A, Malard V, Avazeri E, Roudeau S, Porcaro F, Paredes E, Vidaud C, Bresson C, Ortega R (2018) Uranium exposure of human dopaminergic cells results in low cytotoxicity, accumulation within sub-cytoplasmic regions, and down regulation of MAO-B. *Neurotoxicology* 68:177-188

Carriere M, Avoscan L, Collins R, Carrot F, Khodja H, Ansoborlo E, Gouget B (2004) Influence of uranium speciation on normal rat kidney (NRK-52E) proximal cell cytotoxicity. *Chem Res Toxicol* 17:446-452

Carriere M, Proux O, Milgram S, Thiebault C, Avoscan L, Barre N, Den Auwer C, Gouget B (2008) Transmission electron microscopic and X-ray absorption fine structure spectroscopic investigation of U repartition and speciation after accumulation in renal cells. *Journal of biological inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry* 13:655-662

Carriere MK, H.; Avoscan, L.; Carrot, F.; Gouget, B. (2005) Uranium(VI) complexation in cell culture medium: influence of speciation on normal rat kidney (NRK-52E) cell accumulation. *Radiochim* 93:691-697

Checkoway H, Pearce N, Crawford-Brown DJ, Cragle DL (1988) Radiation doses and cause-specific mortality among workers at a nuclear materials fabrication plant. *American journal of epidemiology* 127:255-266

Cooper JR, Stradling GN, Smith H, Ham SE (1982) The behaviour of uranium-233 oxide and uranyl-233 nitrate in rats. *Int J Radiat Biol* 41:421-433

Cooper KL, Dashner EJ, Tsosie R, Cho YM, Lewis J, Hudson LG (2016) Inhibition of poly(ADP-ribose)polymerase-1 and DNA repair by uranium. *Toxicology and applied pharmacology* 291:13-20

Coryell VH, Stearns DM (2006) Molecular analysis of hprt mutations induced by chromium picolinate in CHO AA8 cells. *Mutat Res* 610:114-123

Craft E, Abu-Qare A, Flaherty M, Garofolo M, Rincavage H, Abou-Donia M (2004) Depleted and natural uranium: chemistry and toxicological effects. *Journal of toxicology and environmental health Part B, Critical reviews* 7:297-317

Dedieu A, Berenguer F, Basset C, Prat O, Quemeneur E, Pible O, Vidaud C (2009) Identification of uranyl binding proteins from human kidney-2 cell extracts by immobilized uranyl affinity chromatography and mass spectrometry. *Journal of chromatography A* 1216:5365-5376

Diamond GL, Morrow PE, Panner BJ, Gelein RM, Baggs RB (1989) Reversible uranyl fluoride nephrotoxicity in the Long Evans rat. *Fundamental and applied toxicology : official journal of the Society of Toxicology* 13:65-78



Ding W, Liu W, Cooper KL, Qin XJ, de Souza Bergo PL, Hudson LG, Liu KJ (2009) Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by arsenite interferes with repair of oxidative DNA damage. *The Journal of biological chemistry* 284:6809-6817

Dupree EA, Cragle DL, McLain RW, Crawford-Brown DJ, Teta MJ (1987) Mortality among workers at a uranium processing facility, the Linde Air Products Company Ceramics Plant, 1943-1949. *Scandinavian journal of work, environment & health* 13:100-107

Eisenbud M, Quigley JA (1956) Industrial hygiene of uranium processing. *AMA archives of industrial health* 14:12-22

Faa A, Gerosa C, Fanni D, Floris G, Eyken PV, Lachowicz JI, Nurchi VM (2018) Depleted Uranium and Human Health. *Current medicinal chemistry* 25:49-64

Fister SL, Jovic SZ (2014) The frequency of chromosomal aberrations in sheep from the area contaminated by depleted uranium during nato air strikes in 1999. *Nucl Technol Radiat* 29:88-95

Frelon S, Houpert P, Lepetit D, Paquet F (2005) The chemical speciation of uranium in water does not influence its absorption from the gastrointestinal tract of rats. *Chem Res Toxicol* 18:1150-1154

Fukuda S, Iida H, Ikeda M, Yan X, Xie Y (2005) Toxicity of uranium and the removal effects of CBMIDA and EHBP in simulated wounds of rats. *Health physics* 89:81-88

Garmash SA, Smirnova VS, Karp OE, Usacheva AM, Berezhnov AV, Ivanov VE, Chernikov AV, Bruskov VI, Gudkov SV (2014) Pro-oxidative, genotoxic and cytotoxic properties of uranyl ions. *Journal of environmental radioactivity* 127:163-170

Gazin V, Kerdine S, Grillon G, Pallardy M, Raoul H (2004) Uranium induces TNF alpha secretion and MAPK activation in a rat alveolar macrophage cell line. *Toxicology and applied pharmacology* 194:49-59

Ghadially FN, Lalonde JM, Yong NK (1982) Uraniosomes produced in the synovial membrane by uranyl acetate. *Pathology* 14:121-127

Gilman AP, Villeneuve DC, Secours VE, Yagminas AP, Tracy BL, Quinn JM, Valli VE, Willes RJ, Moss MA (1998) Uranyl nitrate: 28-day and 91-day toxicity studies in the Sprague-Dawley rat. *Toxicol Sci* 41:117-128

Goldman M, Yaari A, Doshnitzki Z, Cohen-Luria R, Moran A (2006) Nephrotoxicity of uranyl acetate: effect on rat kidney brush border membrane vesicles. *Arch Toxicol* 80:387-393

Gueguen Y, Rouas C (2012) New data on uranium nephrotoxicity. *Radioprotection* 47:345-359

Gueguen Y, Roy L, Hornhardt S, Badie C, Hall J, Baatout S, Pernot E, Tomasek L, Laurent O, Ebrahimiyan T, Ibanez C, Grison S, Kabacik S, Laurier D, Gomolka M (2017) Biomarkers for Uranium Risk Assessment for the Development of the CURE (Concerted Uranium Research in Europe) Molecular Epidemiological Protocol. *Radiat Res* 187:107-127

Gueguen Y, Suhard D, Poisson C, Manens L, Elie C, Landon G, Bouvier-Capely C, Rouas C, Benderitter M, Tessier C (2015) Low-concentration uranium enters the HepG2 cell nucleus rapidly and induces cell stress response. *Toxicol In Vitro* 30:552-560

Haley DP (1982) Morphologic changes in uranyl nitrate-induced acute renal failure in saline- and water-drinking rats. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 46:196-208

Haley DP, Bulger RE, Dobyhan DC (1982) The long-term effects of uranyl nitrate on the structure and function of the rat kidney. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 41:181-192

Hallum NS, Baxter JP, O'Reilly DS, McKee RF (2010) Home parenteral nutrition in Scotland: frequency of monitoring, adequacy of review and consequence for complication rates. *Nutrition* 26:1139-1145

Hamilton MM, Ejnik JW, Carmichael AJ (1997) Uranium reactions with hydrogen peroxide studied by EPR-spin trapping with DMPO. *J Chem Soc, Perkin Trans 2*:2491-2494

Hao Y, Huang J, Gu Y, Liu C, Li H, Liu J, Ren J, Yang Z, Peng S, Wang W, Li R (2015) Metallothionein deficiency aggravates depleted uranium-induced nephrotoxicity. *Toxicology and applied pharmacology* 287:306-315

Hao Y, Huang J, Liu C, Li H, Liu J, Zeng Y, Yang Z, Li R (2016a) Differential protein expression in metallothionein protection from depleted uranium-induced nephrotoxicity. *Sci Rep* 6:38942



Hao Y, Liu C, Huang J, Gu Y, Li H, Yang Z, Liu J, Wang W, Li R (2016b) Ghrelin protects against depleted uranium-induced apoptosis of MC3T3-E1 cells through oxidative stress-mediated p38-mitogen-activated protein kinase pathway. *Toxicology and applied pharmacology* 290:116-125

Hao Y, Ren J, Liu C, Li H, Liu J, Yang Z, Li R, Su Y (2014) Zinc protects human kidney cells from depleted uranium-induced apoptosis. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 114:271-280

Hao Y, Ren J, Liu J, Luo S, Ma T, Li R, Su Y (2012) The protective role of zinc against acute toxicity of depleted uranium in rats. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 111:402-410

Hao Y, Ren J, Liu J, Yang Z, Liu C, Li R, Su Y (2013) Immunological changes of chronic oral exposure to depleted uranium in mice. *Toxicology* 309:81-90

Hartsock WJ, Cohen JD, Segal DJ (2007) Uranyl acetate as a direct inhibitor of DNA-binding proteins. *Chemical research in toxicology* 20:784-789

Hartwig A (2013a) Cadmium and cancer. *Metal ions in life sciences* 11:491-507

Hartwig A (2013b) Metal interaction with redox regulation: an integrating concept in metal carcinogenesis? *Free radical biology & medicine* 55:63-72

Hawkins CL, Davies MJ (2001) Generation and propagation of radical reactions on proteins. *Biochimica et biophysica acta* 1504:196-219

Holmes AL, Joyce K, Xie H, Falank C, Hinz JM, Wise JP, Sr. (2014) The impact of homologous recombination repair deficiency on depleted uranium clastogenicity in Chinese hamster ovary cells: XRCC3 protects cells from chromosome aberrations, but increases chromosome fragmentation. *Mutat Res* 762:1-9

Homma-Takeda S, Kitahara K, Suzuki K, Blyth BJ, Suya N, Konishi T, Terada Y, Shimada Y (2015) Cellular localization of uranium in the renal proximal tubules during acute renal uranium toxicity. *J Appl Toxicol*

Homma-Takeda S, Terada Y, Nakata A, Sahoo SK, Yoshida S, Ueno S, Inoue M, Iso H, Ishikawa T, Konishi T, Imaseki H, Shimada Y (2009) Elemental imaging of kidneys of adult rats exposed to uranyl acetate. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 267:2167-2170

Hourihan JM, Kenna JG, Hayes JD (2013) The gasotransmitter hydrogen sulfide induces nrf2-target genes by inactivating the keap1 ubiquitin ligase substrate adaptor through formation of a disulfide bond between cys-226 and cys-613. *Antioxid Redox Signal* 19:465-481

Hurault L, Creff G, Hagege A, Santucci-Darmanin S, Pagnotta S, Farlay D, Den Auwer C, Pierrefite-Carle V, Carle GF (2019) Uranium Effect on Osteocytic Cells In Vitro. *Toxicol Sci* 170:199-209

Huxley HE, Zubay G (1961) Preferential staining of nucleic acid-containing structures for electron microscopy. *J Biophys Biochem Cytol* 11:273-296

Ibrulj S, Haveric S, Haveric A (2007) Chromosome aberrations as bioindicators of environmental genotoxicity. *Bosnian journal of basic medical sciences* 7:311-316

Iwakura T, Fujigaki Y, Fujikura T, Ohashi N, Kato A, Yasuda H (2016) Acquired resistance to rechallenge injury after acute kidney injury in rats is associated with cell cycle arrest in proximal tubule cells. *American journal of physiology Renal physiology* 310:F872-884

Jin F, Ma T, Guan H, Yang ZH, Liu XD, Wang Y, Jiang YG, Zhou PK (2017) Inhibitory effect of uranyl nitrate on DNA double-strand break repair by depression of a set of proteins in the homologous recombination pathway. *Toxicol Res (Camb)* 6:711-718

Juntunen R (1991) Etelä-Suomen kallioporakaivojen uraani- ja radontutkimukset (Uranium and radon in wells drilled into bedrocks in southern Finland). Report of Investigation, Geological Survey of Finland, Espoo 98

Kalinich JF, Ramakrishnan N, Villa V, McClain DE (2002) Depleted uranium-uranyl chloride induces apoptosis in mouse J774 macrophages. *Toxicology* 179:105-114

Karpas Z, Lorber A, Elish E, Kol R, Roiz Y, Marko R, Katorza E, Halicz L, Riondato J, Vanhaecke F, Moens L (1998) Uptake of ingested uranium after low "acute intake". *Health physics* 74:337-345

Kathren RL, Moore RH (1986) Acute accidental inhalation of U: a 38-year follow-up. *Health physics* 51:609-619

Kimura H, Shibuya N, Kimura Y (2012) Hydrogen sulfide is a signaling molecule and a cytoprotectant. *Antioxid Redox Signal* 17:45-57





Kitahara K, Numako C, Terada Y, Nitta K, Shimada Y, Homma-Takeda S (2017) Uranium XAFS analysis of kidney from rats exposed to uranium. *Journal of synchrotron radiation* 24:456-462

Knobel Y, Gleis M, Weise A, Osswald K, Schaferhenrich A, Richter KK, Claussen U, Pool-Zobel BL (2006) Uranyl nitratotriacetate, a stabilized salt of uranium, is genotoxic in nontransformed human colon cells and in the human colon adenoma cell line LT97. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 93:286-297

Ko GJ, Grigoryev DN, Linfert D, Jang HR, Watkins T, Cheadle C, Racusen L, Rabb H (2010) Transcriptional analysis of kidneys during repair from AKI reveals possible roles for NGAL and KIM-1 as biomarkers of AKI-to-CKD transition. *American journal of physiology Renal physiology* 298:F1472-1483

Konietzka R (2015) Gastrointestinal absorption of uranium compounds--a review. *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP* 71:125-133

Kurttio P, Auvinen A, Salonen L, Saha H, Pekkanen J, Makelainen I, Vaisanen SB, Penttila IM, Komulainen H (2002) Renal effects of uranium in drinking water. *Environ Health Perspect* 110:337-342

Kurttio P, Harmoinen A, Saha H, Salonen L, Karpas Z, Komulainen H, Auvinen A (2006) Kidney toxicity of ingested uranium from drinking water. *Am J Kidney Dis* 47:972-982

L'Azou B, Henge-Napoli MH, Minaro L, Mirto H, Barrouillet MP, Cambar J (2002) Effects of cadmium and uranium on some in vitro renal targets. *Cell Biol Toxicol* 18:329-340

La Touche YD, Willis DL, Dawydiak OI (1987) Absorption and biokinetics of U in rats following an oral administration of uranyl nitrate solution. *Health Phys* 53:147-162

LaCerte C, Xie H, Aboueissa AM, Wise JP, Sr. (2010) Particulate depleted uranium is cytotoxic and clastogenic to human lung epithelial cells. *Mutat Res* 697:33-37

Leggett RW (1989) The behavior and chemical toxicity of U in the kidney: a reassessment. *Health physics* 57:365-383

Leggett RW, Harrison JD (1995) Fractional absorption of ingested uranium in humans. *Health Phys* 68:484-498

Leggett RW, Pellmar TC (2003) The biokinetics of uranium migrating from embedded DU fragments. *J Environ Radioact* 64:205-225

Li L, Rose P, Moore PK (2011) Hydrogen sulfide and cell signaling. *Annual review of pharmacology and toxicology* 51:169-187

Lin RH, Wu LJ, Lee CH, Lin-Shiau SY (1993) Cytogenetic toxicity of uranyl nitrate in Chinese hamster ovary cells. *Mutat Res* 319:197-203

Linares V, Belles M, Albina ML, Sirvent JJ, Sanchez DJ, Domingo JL (2006) Assessment of the pro-oxidant activity of uranium in kidney and testis of rats. *Toxicology letters* 167:152-161

Lu S, Zhao FY (1990) Nephrotoxic limit and annual limit on intake for natural U. *Health physics* 58:619-623

Luessenhop AJ, Gallimore JC, Sweet WH, Struxness EG, Robinson J (1958) The toxicity in man of hexavalent uranium following intravenous administration. *The American journal of roentgenology, radium therapy, and nuclear medicine* 79:83-100

Lundin FE, Jr. (1969) Lloyd JW, Smith EM, Archer VE, Holaday DA: Mortality of uranium miners in relation to radiation exposure, hard-rock mining and cigarette smoking--1950 through September 1967. *Health physics* 16:571-578

McDiarmid MA, Engelhardt S, Oliver M, Gucer P, Wilson PD, Kane R, Kabat M, Kaup B, Anderson L, Hoover D, Brown L, Handwerger B, Albertini RJ, Jacobson-Kram D, Thorne CD, Squibb KS (2004) Health effects of depleted uranium on exposed Gulf War veterans: a 10-year follow-up. *Journal of toxicology and environmental health Part A* 67:277-296

McDiarmid MA, Engelhardt SM, Oliver M, Gucer P, Wilson PD, Kane R, Cernich A, Kaup B, Anderson L, Hoover D, Brown L, Albertini R, Gudi R, Jacobson-Kram D, Squibb KS (2007) Health surveillance of Gulf War I veterans exposed to depleted uranium: updating the cohort. *Health physics* 93:60-73

McDiarmid MA, Engelhardt SM, Oliver M, Gucer P, Wilson PD, Kane R, Kabat M, Kaup B, Anderson L, Hoover D, Brown L, Albertini RJ, Gudi R, Jacobson-Kram D, Thorne CD, Squibb KS (2006) Biological



monitoring and surveillance results of Gulf War I veterans exposed to depleted uranium. *International archives of occupational and environmental health* 79:11-21

McDiarmid MA, Keogh JP, Hooper FJ, McPhaul K, Squibb K, Kane R, DiPino R, Kabat M, Kaup B, Anderson L, Hoover D, Brown L, Hamilton M, Jacobson-Kram D, Burrows B, Walsh M (2000) Health effects of depleted uranium on exposed Gulf War veterans. *Environ Res* 82:168-180

Milacic S, Simic J (2009) Identification of health risks in workers staying and working on the terrains contaminated with depleted uranium. *Journal of radiation research* 50:213-222

Milgram S, Carriere M, Malaval L, Gouget B (2008) Cellular accumulation and distribution of uranium and lead in osteoblastic cells as a function of their speciation. *Toxicology* 252:26-32

Miller AC (2006) *Depleted uranium: properties, uses, and health consequences*. Boca Raton CRC Press:288

Miller AC (2007) Observation of radiation-specific damage in cells exposed to depleted uranium: hprt gene mutation frequency. *Radiation Measurements*:1029-1032

Miller AC, Brooks K, Stewart M, Anderson B, Shi L, McClain D, Page N (2003) Genomic instability in human osteoblast cells after exposure to depleted uranium: delayed lethality and micronuclei formation. *J Environ Radioact* 64:247-259

Miller AC, Stewart M, Brooks K, Shi L, Page N (2002a) Depleted uranium-catalyzed oxidative DNA damage: absence of significant alpha particle decay. *J Inorg Biochem* 91:246-252

Miller AC, Xu J, Stewart M, Brooks K, Hodge S, Shi L, Page N, McClain D (2002b) Observation of radiation-specific damage in human cells exposed to depleted uranium: dicentric frequency and neoplastic transformation as endpoints. *Radiat Prot Dosimetry* 99:275-278

Mirto H, Barrouillet MP, Henge-Napoli MH, Ansoborlo E, Fournier M, Cambar J (1999a) Influence of uranium(VI) speciation for the evaluation of in vitro uranium cytotoxicity on LLC-PK1 cells. *Human & experimental toxicology* 18:180-187

Mirto H, Henge-Napoli MH, Gibert R, Ansoborlo E, Fournier M, Cambar J (1999b) Intracellular behaviour of uranium(VI) on renal epithelial cell in culture (LLC-PK1): influence of uranium speciation. *Toxicology letters* 104:249-256

Monleau M, De Meo M, Frelon S, Paquet F, Donnadiou-Claraz M, Dumenil G, Chazel V (2006a) Distribution and genotoxic effects after successive exposure to different uranium oxide particles inhaled by rats. *Inhal Toxicol* 18:885-894

Monleau M, De Meo M, Paquet F, Chazel V, Dumenil G, Donnadiou-Claraz M (2006b) Genotoxic and inflammatory effects of depleted uranium particles inhaled by rats. *Toxicol Sci* 89:287-295

Morrow P, Gelein R, Beiter H, Scott J, Picano J, Yuile C (1982) Inhalation and intravenous studies of UF<sub>6</sub>/UO<sub>2</sub>F<sub>2</sub> in dogs. *Health Phys* 43:859-873

Moss MA (1983) *Uranium in drinking water - report on clinical studies in Nova Scotia Chemical toxicology and clinical chemistry of metals*. Dalhousie Univ., Halifax, Nova Scotia (Canada), Montreal, Canada

Muller D, Houpert P, Cambar J, Henge-Napoli MH (2006) Role of the sodium-dependent phosphate co-transporters and of the phosphate complexes of uranyl in the cytotoxicity of uranium in LLC-PK1 cells. *Toxicology and applied pharmacology* 214:166-177

Muller DSH, P.; Cambar, J.; Hengé-Napoli, M. H. (2008) Role of sodium-dependent phosphate cotransporters and absorptive endocytosis in the uptake of low concentrations of uranium and its toxicity at higher concentrations in LLC-PK1 cells. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 101:254-262

Nielsen PE, Hiort C, Sönnichsen SH, Buchardt O, Dahl O, Norden B (1992) DNA binding and photocleavage by uranyl(VI) salts. *Journal of the American Chemical Society* 114:4967-4975

Nriagu J, Nam DH, Ayanwola TA, Dinh H, Erdenechimeg E, Ochir C, Bolormaa TA (2012) High levels of uranium in groundwater of Ulaanbaatar, Mongolia. *The Science of the total environment* 414:722-726

Ortega A, Domingo JL, Llobet JM, Tomas JM, Paternain JL (1989) Evaluation of the oral toxicity of uranium in a 4-week drinking-water study in rats. *Bull Environ Contam Toxicol* 42:935-941



Paquet F, Houpert P, Blanchardon E, Delissen O, Maubert C, Dhieux B, Moreels AM, Frelon S, Gourmelon P (2006) Accumulation and distribution of uranium in rats after chronic exposure by ingestion. *Health Phys* 90:139-147

Pavlikis N, Pollock CA, McLean G, Bartrop R (1996) Deliberate overdose of uranium: toxicity and treatment. *Nephron* 72:313-317

Pereira S, Camilleri V, Floriani M, Cavalie I, Garnier-Laplace J, Adam-Guillermin C (2012) Genotoxicity of uranium contamination in embryonic zebrafish cells. *Aquat Toxicol* 109:11-16

Periyakaruppan A, Kumar F, Sarkar S, Sharma CS, Ramesh GT (2007) Uranium induces oxidative stress in lung epithelial cells. *Arch Toxicol* 81:389-395

Petitot F, Frelon S, Moreels AM, Claraz M, Delissen O, Tournalias E, Dhieux B, Maubert C, Paquet F (2007) Incorporation and distribution of uranium in rats after a contamination on intact or wounded skin. *Health physics* 92:464-474

Pible O, Vidaud C, Plantevin S, Pellequer JL, Quemeneur E (2010) Predicting the disruption by UO<sub>2</sub>(2+) of a protein-ligand interaction. *Protein science : a publication of the Protein Society* 19:2219-2230

Pierrefite-Carle V, Santucci-Darmanin S, Breuil V, Gritsaenko T, Vidaud C, Creff G, Solari PL, Pagnotta S, Al-Sahlanee R, Auwer CD, Carle GF (2016) Effect of natural uranium on the UMR-106 osteoblastic cell line: impairment of the autophagic process as an underlying mechanism of uranium toxicity. *Arch Toxicol*

Poisson C, Stefani J, Manens L, Delissen O, Suhard D, Tessier C, Dublineau I, Gueguen Y (2014) Chronic uranium exposure dose-dependently induces glutathione in rats without any nephrotoxicity. *Free radical research* 48:1218-1231

Polednak AP, Frome EL (1981) Mortality among men employed between 1943 and 1947 at a uranium-processing plant. *Journal of occupational medicine : official publication of the Industrial Medical Association* 23:169-178

Pourahmad J, Ghashang M, Ettehadi HA, Ghalandari R (2006) A search for cellular and molecular mechanisms involved in depleted uranium (DU) toxicity. *Environmental toxicology* 21:349-354

Pourahmad J, Shaki F, Tanbakosazan F, Ghalandari R, Ettehadi HA, Dahaghin E (2011) Protective effects of fungal beta-(1->3)-D-glucan against oxidative stress cytotoxicity induced by depleted uranium in isolated rat hepatocytes. *Human & experimental toxicology* 30:173-181

Prat O, Berenguer F, Malard V, Tavan E, Sage N, Steinmetz G, Quemeneur E (2005) Transcriptomic and proteomic responses of human renal HEK293 cells to uranium toxicity. *Proteomics* 5:297-306

Priest ND (2001) Toxicity of depleted uranium. *Lancet* 357:244-246

Reisser-Rubrecht L, Torne-Celer C, Renier W, Averseng O, Plantevin S, Quemeneur E, Bellanger L, Vidaud C (2008) High-affinity uranyl-specific antibodies suitable for cellular imaging. *Chemical research in toxicology* 21:349-357

Ren Y, Wang WH, Wang YH, Case M, Qian W, McLendon G, Huang ZX (2004) Mapping the electron transfer interface between cytochrome b5 and cytochrome c. *Biochemistry* 43:3527-3536

Rouas C, Bensoussan H, Suhard D, Tessier C, Grandcolas L, Rebiere F, Dublineau I, Taouis M, Pallardy M, Lestaevel P, Gueguen Y (2010) Distribution of soluble uranium in the nuclear cell compartment at subtoxic concentrations. *Chemical research in toxicology* 23:1883-1889

Salonen L (1994) 238U series radionuclides as a source of increased radioactivity in groundwater originating from Finnish bedrock. *Future Groundwater Resources at Risk (Proceedings of the Helsinki Conference, June 1994)* 222

Sanchez DJ, Belles M, Albina ML, Sirvent JJ, Domingo JL (2001) Nephrotoxicity of simultaneous exposure to mercury and uranium in comparison to individual effects of these metals in rats. *Biol Trace Elem Res* 84:139-154

Sangeetha Vijayan P, Rekha PD, Arun AB (2019) Role of PI3K-Akt and MAPK signaling in uranyl nitrate-induced nephrotoxicity. *Biological trace element research* 189:405-411

Selden AI, Lundholm C, Edlund B, Hogdahl C, Ek BM, Bergstrom BE, Ohlson CG (2009) Nephrotoxicity of uranium in drinking water from private drilled wells. *Environ Res* 109:486-494



Shaki F, Hosseini MJ, Ghazi-Khansari M, Pourahmad J (2012) Toxicity of depleted uranium on isolated rat kidney mitochondria. *Biochimica et biophysica acta* 1820:1940-1950

Shaki F, Hosseini MJ, Ghazi-Khansari M, Pourahmad J (2013) Depleted uranium induces disruption of energy homeostasis and oxidative stress in isolated rat brain mitochondria. *Metallomics : integrated biometal science* 5:736-744

Shaki F, Pourahmad J (2013) Mitochondrial toxicity of depleted uranium: protection by Beta-glucan. *Iranian journal of pharmaceutical research : IJPR* 12:131-140

Smirnova VS, Gudkov SV, Shtarkman IN, Chernikov AV, Bruskov VI (2005) [The genotoxic action of uranyl ions on DNA in vitro caused by the generation of reactive oxygen species]. *Biofizika* 50:456-463

Stearns DM, Yazzie M, Bradley AS, Coryell VH, Shelley JT, Ashby A, Asplund CS, Lantz RC (2005) Uranyl acetate induces hprt mutations and uranium-DNA adducts in Chinese hamster ovary EM9 cells. *Mutagenesis* 20:417-423

Steenken S, Jovanovic SV (1997) How easily oxidizable is DNA? One-electron reduction potentials of adenosine and guanosine radicals in aqueous solution. *Journal of the American Chemical Society* 119:617-618

Suhard D, Tessier C, Manens L, Rebiere F, Tack K, Agarande M, Gueguen Y (2018a) Intracellular uranium distribution: Comparison of cryogenic fixation versus chemical fixation methods for SIMS analysis. *Microscopy research and technique* 81:855-864

Suhard D, Tessier C, Manens L, Rebiere F, Tack K, Agarande M, Gueguen Y (2018b) Intracellular uranium distribution: Comparison of cryogenic fixation versus chemical fixation methods for SIMS analysis. *Microscopy research and technique*

Sun DF, Fujigaki Y, Fujimoto T, Goto T, Yonemura K, Hishida A (2002) Relation of distal nephron changes to proximal tubular damage in uranyl acetate-induced acute renal failure in rats. *American journal of nephrology* 22:405-416

Sun MH, Liu SQ, Du KJ, Nie CM, Lin YW (2014a) A spectroscopic study of uranyl-cytochrome b5/cytochrome c interactions. *Spectrochimica acta Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy* 118:130-137

Sun X, Zhou X, Du L, Liu W, Liu Y, Hudson LG, Liu KJ (2014b) Arsenite binding-induced zinc loss from PARP-1 is equivalent to zinc deficiency in reducing PARP-1 activity, leading to inhibition of DNA repair. *Toxicology and applied pharmacology* 274:313-318

Tanigawara Y, Saito Y, Aiba T, Ohoka K, Kamiya A, Hori R (1990) Moment analysis of drug disposition in kidney. III: Transport of p-aminohippurate and tetraethylammonium in the perfused kidney isolated from uranyl nitrate-induced acute renal failure rats. *Journal of pharmaceutical sciences* 79:249-256

Taulan M, Paquet F, Argiles A, Demaille J, Romey MC (2006) Comprehensive analysis of the renal transcriptional response to acute uranyl nitrate exposure. *BMC Genomics* 7:2

Tessier C, Suhard D, Rebiere F, Souidi M, Dublineau I, Agarande M (2012) Uranium microdistribution in renal cortex of rats after chronic exposure: a study by secondary ion mass spectrometry microscopy. *Microscopy and microanalysis : the official journal of Microscopy Society of America, Microbeam Analysis Society, Microscopical Society of Canada* 18:123-133

Thiebault C, Carriere M, Milgram S, Simon A, Avoscan L, Gouget B (2007) Uranium induces apoptosis and is genotoxic to normal rat kidney (NRK-52E) proximal cells. *Toxicol Sci* 98:479-487

Thun MJ, Baker DB, Steenland K, Smith AB, Halperin W, Berl T (1985) Renal toxicity in uranium mill workers. *Scandinavian journal of work, environment & health* 11:83-90

Tymen H, Gerasimo P, Hoffschir D (2000) Contamination and decontamination of rat and human skin with plutonium and uranium, studied with a Franz's chamber. *International journal of radiation biology* 76:1417-1424

Ubios AM, Marzorati M, Cabrini RL (1997) Skin alterations induced by long-term exposure to uranium and their effect on permeability. *Health physics* 72:713-715

UNSCEAR (2016) Sources, effects and risks of ionizing radiation. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation, U.S.





Vicente-Vicente L, Quiros Y, Perez-Barriocanal F, Lopez-Novoa JM, Lopez-Hernandez FJ, Morales AI (2010) Nephrotoxicity of uranium: pathophysiological, diagnostic and therapeutic perspectives. *Toxicol Sci* 118:324-347

Wan D, Liao LF, Zhao MM, Wu ML, Wu YM, Lin YW (2012) Interactions of uranyl ion with cytochrome b(5) and its His39Ser variant as revealed by molecular simulation in combination with experimental methods. *Journal of molecular modeling* 18:1009-1013

Weidemann DK, Weaver VM, Fadrowski JJ (2016) Toxic environmental exposures and kidney health in children. *Pediatr Nephrol* 31:2043-2054

Wilson J, Young A, Civitello ER, Stearns DM (2014) Analysis of heat-labile sites generated by reactions of depleted uranium and ascorbate in plasmid DNA. *Journal of biological inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry* 19:45-57

Wilson J, Zuniga MC, Yazzie F, Stearns DM (2015) Synergistic cytotoxicity and DNA strand breaks in cells and plasmid DNA exposed to uranyl acetate and ultraviolet radiation. *J Appl Toxicol* 35:338-349

Wise SS, Thompson WD, Aboueissa AM, Mason MD, Wise JP, Sr. (2007) Particulate depleted uranium is cytotoxic and clastogenic to human lung cells. *Chemical research in toxicology* 20:815-820

Wrenn ME, Durbin PW, Howard B, Lipsztein J, Rundo J, Still ET, Willis DL (1985) Metabolism of ingested U and Ra. *Health physics* 48:601-633

Wu Q, Cheng X, Hofstadler SA, Smith RD (1996) Specific metal-oligonucleotide binding studied by high resolution tandem mass spectrometry. *Journal of mass spectrometry : JMS* 31:669-675

Yazzie M, Gamble SL, Civitello ER, Stearns DM (2003) Uranyl acetate causes DNA single strand breaks in vitro in the presence of ascorbate (vitamin C). *Chemical research in toxicology* 16:524-530

Yellowhair M, Romanotto MR, Stearns DM, Clark Lantz R (2018) Uranyl acetate induced DNA single strand breaks and AP sites in Chinese hamster ovary cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 349:29-38

Yi J, Yuan Y, Zheng J, Hu N (2018) Hydrogen sulfide alleviates uranium-induced kidney cell apoptosis mediated by ER stress via 20S proteasome involving in Akt/GSK-3beta/Fyn-Nrf2 signaling. *Free Radic Res* 52:1020-1029

Yi J, Yuan Y, Zheng J, Zhao T (2019) Hydrogen sulfide alleviates uranium-induced rat hepatocyte cytotoxicity via inhibiting Nox4/ROS/p38 MAPK pathway. *Journal of biochemical and molecular toxicology* 33:e22255

Yuan Y, Zheng J, Zhao T, Tang X, Hu N (2016) Uranium-induced rat kidney cell cytotoxicity is mediated by decreased endogenous hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) generation involved in reduced Nrf2 levels. *Toxicol Res (Camb)* 5:660-673

Yuan Y, Zheng J, Zhao T, Tang X, Hu N (2017) Hydrogen sulfide alleviates uranium-induced acute hepatotoxicity in rats: Role of antioxidant and antiapoptotic signaling. *Environmental toxicology* 32:581-593

Yue YC, Li MH, Wang HB, Zhang BL, He W (2018) The toxicological mechanisms and detoxification of depleted uranium exposure. *Environmental health and preventive medicine* 23:18

Zamora ML, Tracy BL, Zielinski JM, Meyerhof DP, Moss MA (1998) Chronic ingestion of uranium in drinking water: a study of kidney bioeffects in humans. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 43:68-77

Zheng J, Zhao T, Yuan Y, Hu N, Tang X (2015) Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) attenuates uranium-induced acute nephrotoxicity through oxidative stress and inflammatory response via Nrf2-NF-kappaB pathways. *Chem Biol Interact* 242:353-362

Zhou X, Cooper KL, Sun X, Liu KJ, Hudson LG (2015) Selective Sensitization of Zinc Finger Protein Oxidation by Reactive Oxygen Species through Arsenic Binding. *The Journal of biological chemistry* 290:18361-18369

Zhu G, Xiang X, Chen X, Wang L, Hu H, Weng S (2009) Renal dysfunction induced by long-term exposure to depleted uranium in rats. *Arch Toxicol* 83:37-46



**Figure 1. Schematic representation of U-induced nephrotoxicity.** Starting from the exposure of U and its distribution, the identified molecular pathways (molecular initiating and key events), and the cellular and tissue response leading to adverse kidney effects (renal impairment and carcinogenesis). ER, endoplasmic reticulum ; CKD, chronic kidney disease.

**Figure 2. Representative network of U-induced molecular and cellular events leading to tissue damages and adverse outcomes in the kidney inspired by the AOP approach.** Molecular initiating events (MIEs) are represented in green rectangles, whereas molecular and cellular key events (MKEs and CKEs) are represented in blue circles. Finally, the resulting adverse outcomes (AOs) are represented in red rectangles. Blue filled arrows are proven links of induction based on experimental or epidemiological studies of U nephrotoxicity, whereas gray segments represent links of inhibition. Blue dotted arrows represent hypothetical links existing between the different key events.



**Figure 1**

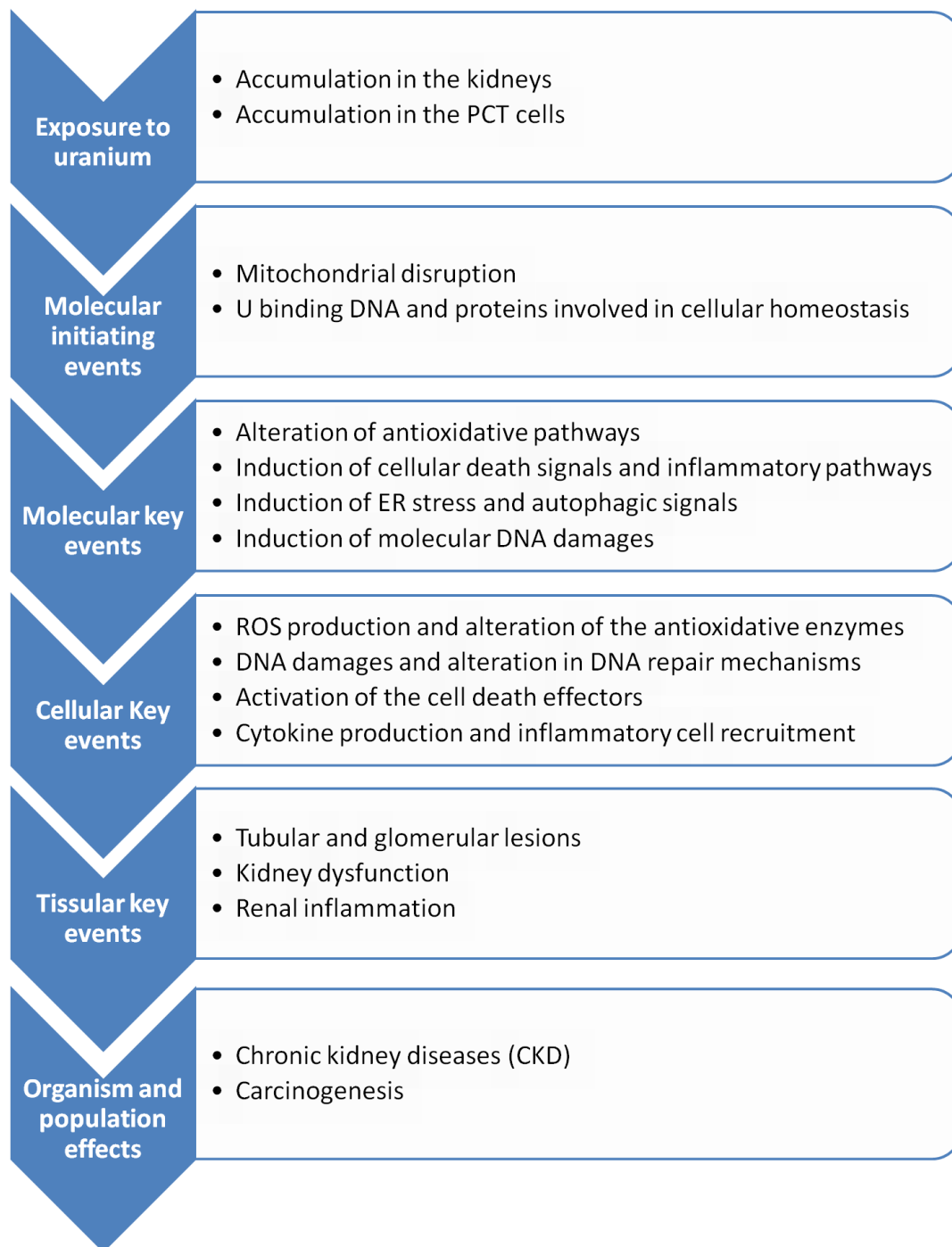
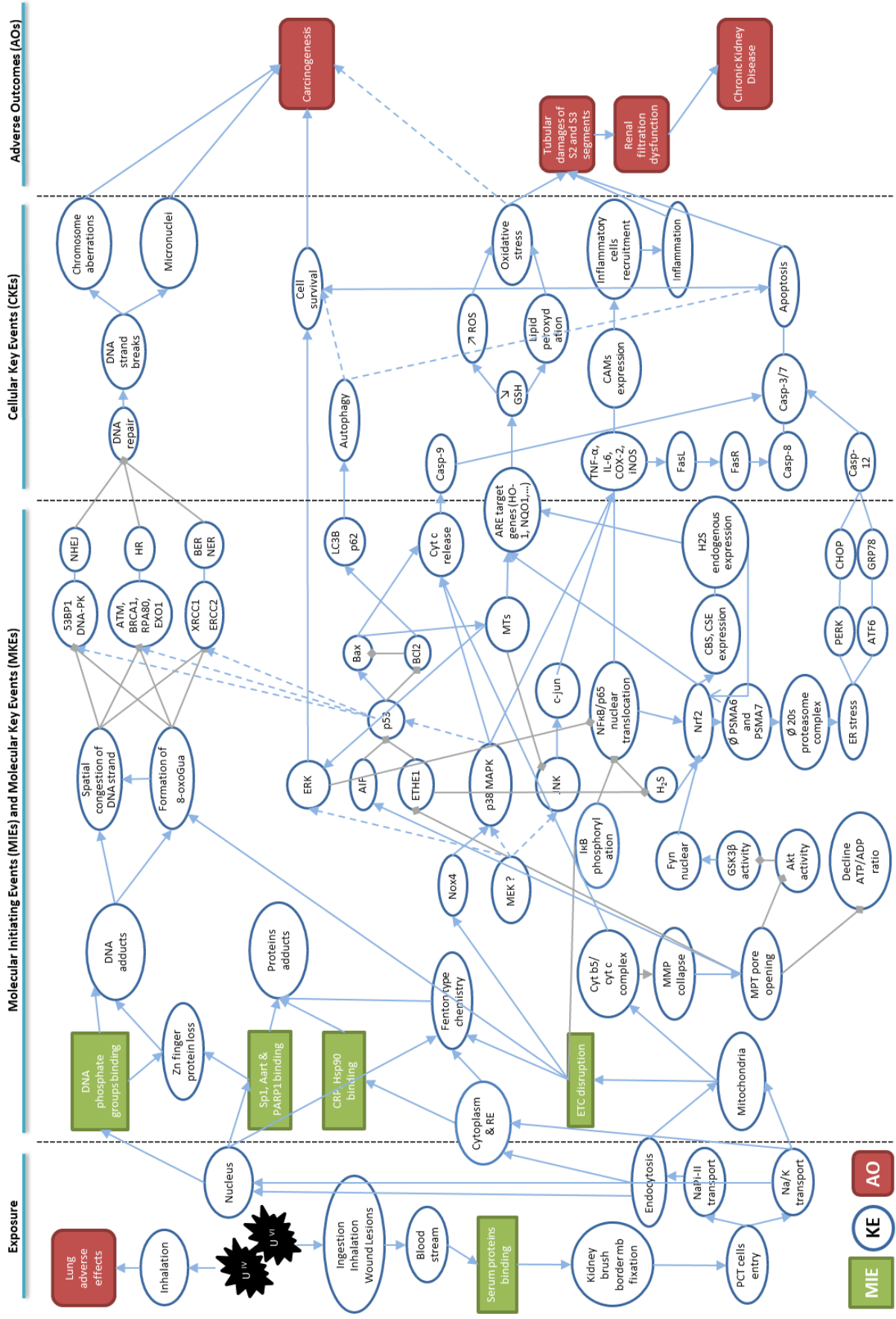




Figure 2









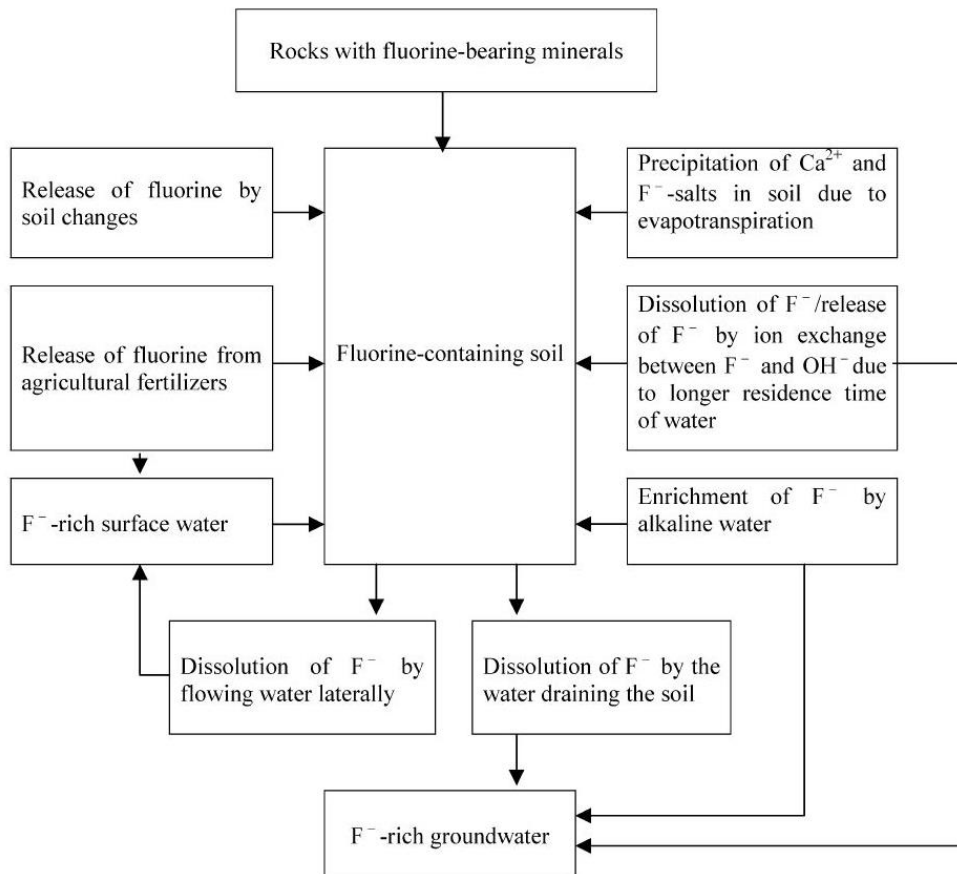


Figure 16 : Schéma représentant l'occurrence du fluor dans les nappes phréatiques

Source : Rao and Devadas 2003

## IV. Le fluor

### A. Généralités

#### 1. Propriétés chimiques

De symbole F et de numéro atomique 9, le fluor est l'élément le plus léger de la famille des halogènes. Il possède 18 isotopes, mais seul le  $^{19}\text{F}$  est un isotope stable.

Avec une électronégativité de 3.98, le fluor est l'élément chimique le plus réactif du tableau périodique, et c'est pourquoi il forme de nombreux complexes avec d'autres éléments, créant ainsi des oxydes de fluor ou des minéraux tels que la fluorine, la fluorite, la fluorapatite ou la cryolite (ATSDR. 2003; WHO 2002). Le fluor est un atome possédant 9 électrons, et il a, par conséquent, la configuration électronique suivante :  $1s^2 2s^2 2p^5$ . Il a donc propension à gagner un électron pour respecter la règle de l'octet, c'est-à-dire pour avoir 8 électrons dans sa couche de valence. Ainsi, sa configuration électrique devient :  $1s^2 2s^2 2p^6$ , et il forme l'ion fluorure  $\text{F}^-$ .

Dans des conditions normales de température et de pression, le fluor se trouve sous forme de difluor  $\text{F}_2$ , un gaz de couleur jaune pâle qui possède une odeur très prononcée. Ce gaz diatomique est très toxique et corrosif, mais c'est aussi un oxydant très puissant.

#### 2. Origine et utilisations

Le fluor est le treizième élément le plus abondant de la croûte terrestre (0.06 à 0.09%), avec une abondance de 300 mg/kg. Les réservoirs principaux de fluor dans la biosphère sont les roches, le sol, et les océans (Brindha and Elango 2011; Tebbutt 1983; Weinstein and Davison 2004). L'érosion des roches qui contiennent des minéraux riches en fluor tels que la fluorine, la fluorite, la fluorapatite ou la cryolite, ainsi que les émissions de gaz et de cendres volcaniques riches en fluor induisent sa dispersion dans l'eau et dans l'air (Cronin et al. 2003; Momot 1964) (**figure 16**). Du fait de l'hétérogénéité de sa concentration dans la croûte terrestre, certaines régions du monde possèdent des nappes phréatiques naturellement plus riches en fluorure de calcium.

Bien que le fluor soit naturellement présent dans l'environnement, son utilisation industrielle a considérablement augmenté les concentrations auxquelles l'Homme est exposé. Même si ce dernier ne possède aucun rôle métabolique chez les mammifères, il a été supposé que sa présence dans l'eau potable permettrait de prévenir l'apparition de caries dentaires. En effet, c'est en 1874 que l'allemand Carl Erhardt émet l'hypothèse que le fluorure de potassium permet de protéger les dents contre les caries (Erharde 1874), et c'est 10 ans plus tard que le médecin britannique James Crichton-Browne fut le premier à proposer d'ajouter des fluorures dans notre alimentation quotidienne afin de prévenir l'apparition de caries. En 1938, le chirurgien-dentiste H. Trendley Dean publia sur les fluoroses, en mettant en évidence le fait que les victimes de fluorose avaient moins de caries que le reste de la population (Dean 2006). Les USA commencèrent à pratiquer la fluoration de l'eau en ajoutant artificiellement des ions fluorures dans le système de distribution de l'eau potable, avec un fort appui de l'American Dental Association (ADA) (Ripa 1993). Depuis, une vingtaine de pays pratiquent également la fluoration de l'eau. Cette dernière était d'abord faite avec l'ajout de NaF pour ses propriétés solubles, mais aujourd'hui la majorité des pays ajoutent le fluor sous forme de fluorosilicate de sodium d'acide hexafluorosilicique. Depuis ce phénomène de fluoration de l'eau, de nombreux doutes ont été émis sur les bénéfices de cet ajout face aux risques potentiels. Une revue

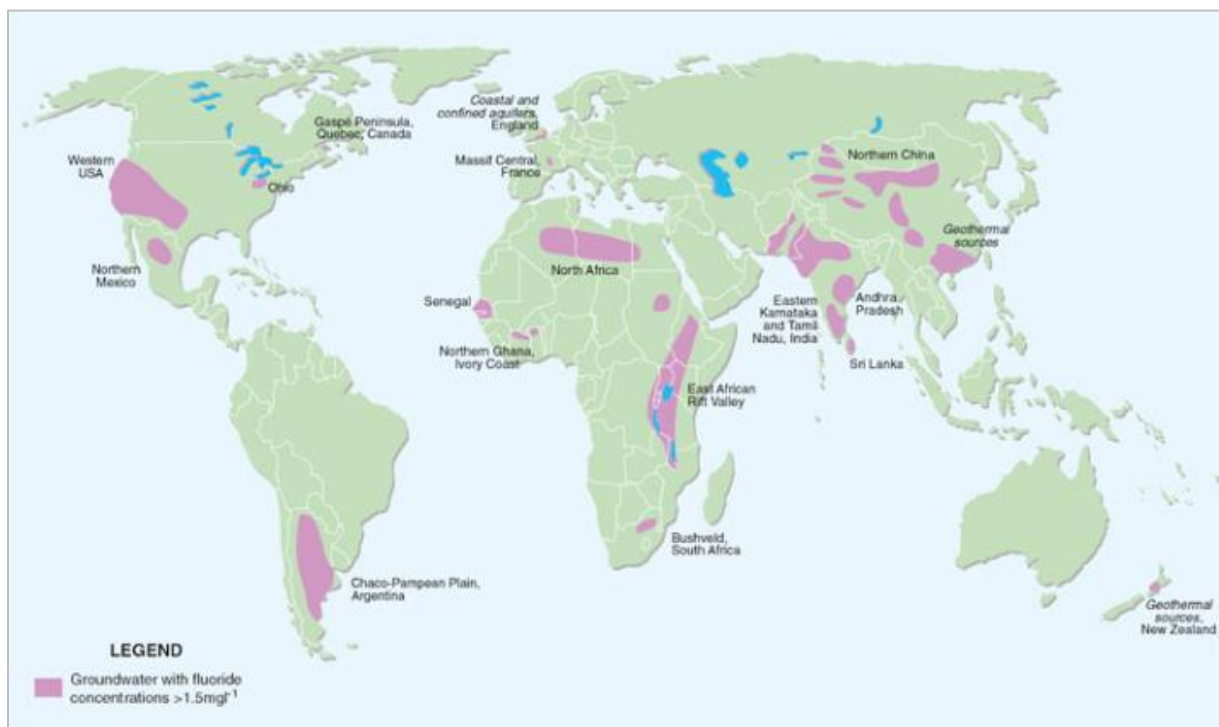


Figure 17 : Carte mondiale des nappes phréatiques aux niveaux de fluor supérieurs à 1.5 mg/L

Source : NHMRC 2007

récente a mis en évidence l'absence de lien direct entre l'ajout de fluor dans les eaux de distribution et la diminution de la prévalence de caries, tout en observant une corrélation entre la fluoration de l'eau et l'apparition de fluorose (Ihezor-Ejiofor et al. 2015). De plus en plus d'études sur les bénéfices/risques de la supplémentation en fluor apparaissent dans la littérature, notamment au Canada (Locker et al. 1999; Stoneman et al. 2014). Du fait qu'on le pense capable de prévenir l'apparition de caries dentaires, le fluor est aussi présent à des concentrations très élevées (1500 mg/L ou plus) dans de nombreux produits d'hygiène bucco-dentaires, notamment dans le dentifrice.

Dans le domaine de l'industrie, le difluor est produit par le procédé d'électrolyse inventé par Henri Moissan en 1886, mais ne peut être utilisé à l'état pur du fait de sa très forte réactivité avec les autres éléments. Le fluor est utilisé industriellement sous forme de composés chimiques, tels que les fluoropolymères comme le polytétrafluoroéthylène (PTFE) utilisé comme revêtement antiadhésif dans les ustensiles de cuisine (Téflon®). Les gaz fluorés tel que le fréon (utilisé comme fluide frigorigène) ou encore les acides fluorhydriques ont la propriété de pouvoir dissoudre tous les oxydes inorganiques. Ces derniers sont alors utilisés pour éliminer les oxydes de surface du silicium dans l'industrie des semi-conducteurs ou encore pour catalyser les réactions d'alkylation de l'isobutane et du butène dans le raffinage du pétrole. De plus, le fluor est également utilisé dans le domaine de l'agro-alimentaire, avec la dispersion de certains pesticides et d'engrais phosphatés dont le minéral principal est le phosphate calcique naturel, soit une fluorapatite phosphocalcique.

### 3. Sources d'expositions chez l'Homme

Le fluor est présent dans les eaux de surface avec une gamme de 0.02 à 1.5 mg/L, bien que sa concentration dans les eaux douces ne dépassent rarement 0.3 mg/L, et sa concentration est plus forte dans les régions avec des activités volcaniques et géothermiques (Brindha and Elango 2011; NHMRC 2007). Certaines régions du monde atteignent des concentrations allant jusqu'à 30 mg/L (WHO 2006), tandis que l'Organisation Mondiale de la Santé en 2011 recommande de ne pas dépasser la concentration de 1.5 mg/L dans l'eau de boisson (WHO 2011). Par exemple, les concentrations de fluor retrouvées dans la région nord-est du Niger atteignent jusqu'à 2.07 mg/L dans les eaux de surface et 2.42 mg/L dans les nappes phréatiques (Waziri et al. 2012). Le système du rift Est-Africain (depuis la Jordanie jusqu'au Kenya et la Tanzanie en Afrique de l'Est), le Moyen-Orient (l'Iran, l'Iraq et la Syrie), le sous-continent indien (l'Inde, le Pakistan, le Sri-Lanka), la Chine et certaines régions des USA présentent des taux de fluor importants, supérieurs à 1.5 mg/L (NHMRC 2007). La **figure 17** représente les zones géographiques possédant des eaux souterraines avec une teneur en fluor supérieure à 1.5 mg/L (Edmunds and Smedley 2013).

Les études épidémiologiques ne s'accordent pas toutes quant à la corrélation entre les quantités de fluor présentes dans les eaux de boisson avec les concentrations urinaires de fluor ou la présence de biomarqueurs. Une étude menée sur des populations polonaises a démontré qu'il n'y avait pas de corrélation significative entre la concentration en fluor dans l'eau de boisson et le taux de fluor retrouvé dans les urines. Les auteurs émettent l'hypothèse que les taux élevés de fluor retrouvés dans les urines seraient non seulement dus à la concentration de fluor dans l'eau, mais aussi à l'ingestion d'aliments contaminés et l'inhalation de particules fluorées (Czarnowski et al. 1996), tel que cela a été suggéré de nombreuses fois depuis (Jimenez-Cordova et al. 2019; Jimenez-Farfan et al. 2011; Sarinana-Ruiz et al. 2017). Dans leur étude, Jiménez-Córdova *et al.* (2019) ont mis en évidence



le facteur que constitue l'utilisation de dentifrice fluoré chez les enfants quant aux taux élevés de fluor retrouvés dans les urines.

### **B. Biocinétique dans l'organisme**

#### **1. Absorption**

Le fluor peut pénétrer l'organisme par les trois mêmes voies que l'uranium : l'ingestion, l'inhalation et la voie percutanée (McIvor 1990). La principale voie d'exposition reste l'ingestion pour la majorité de la population, mais cependant de nombreuses études s'intéressent à la toxicité du fluor après inhalation, notamment pour étudier les effets sur les travailleurs des domaines industriels dans lesquels le fluor est utilisé, puisque celui-ci s'avère extrêmement toxique lorsqu'il est sous forme gazeuse. En revanche, le cas d'exposition au fluor par voie transcutanée est plus rare, et par conséquent moins documenté.

##### **a. L'ingestion**

L'ingestion de fluor peut se faire directement par la consommation d'eau de boisson, ou indirectement par la consommation d'aliments contaminés, principalement du fait de son utilisation dans l'industrie du domaine agro-alimentaire dans les engrais phosphatés et les pesticides. Le fluor est absorbé en solution aqueuse, et est converti en fluorure d'hydrogène sous les conditions acides de l'estomac. Ainsi, 40% du fluor ingéré est absorbé au niveau de l'estomac, avec une diffusion du fluorure d'hydrogène à travers la membrane biologique qui est plus rapide que celle des ions fluorures dissociés (Whitford 2011a; Whitford et al. 1994). En effet, la perméabilité membranaire de l'hydrogène de fluorure est 5 à 7 fois supérieure que celle des ions fluorures, ce qui induit une accumulation intracellulaire de fluor supérieure (Gutknecht and Walter 1981). Ainsi, l'absorption du fluor ingéré va dépendre du statut acidobasique du milieu, comme démontré lors d'une étude comparant la toxicité du fluor en condition normale avec sa toxicité après induction d'une alcalose ou d'une acidose métabolique (Reynolds et al. 1978). Ensuite, environ 45% du fluor ingéré est absorbé au niveau intestinal, mais à la différence avec l'absorption stomacale, celle-ci est médiée par une diffusion facilitée avec des transporteurs membranaires, et ne dépend donc pas du pH acide du milieu (He et al. 1998). Au final, plus de 90% du fluor ingéré est absorbé, et certaines études ont même relevé un taux d'absorption supérieur à 99% (Ekstrand 1978; Trautner and Einwag 1987).

Il semblerait qu'une alimentation riche en calcium, ou autres cations formant des complexes avec le fluor, pourrait réduire l'absorption gastro-intestinale du fluor (ATSDR. 2003; Buzalaf and Whitford 2011). En effet, le fluorure de calcium est environ 3000 fois moins soluble que le NaF par exemple (2018), rendant ce complexe moins toxique après ingestion. D'autres complexes tels que le tétrafluoroborate de potassium sont entièrement excrétés par les urines et les fèces, et par conséquent sans toxicité (Cremer and Buttner 1970). D'ailleurs, chez les personnes ingérant une forte quantité de NaF (accidentellement ou par tentative de suicide), l'ingestion de 1% de solution calcique est utilisée pour convertir le fluorure soluble en fluorure de calcium insoluble, limitant ainsi l'absorption, et par conséquent la toxicité du fluor dans l'organisme (McIvor 1990). En revanche, bien qu'il existe une diminution de l'absorption du fluor suite à un régime riche en calcium chez l'adulte (Ekstrand and Ehrnebo 1979; Shulman and Vallejo 1990; Trautner and Einwag 1987), ce phénomène n'a pas été retrouvé chez l'enfant (Ekstrand et al. 1994b).





### b. L'inhalation

L'inhalation de fluor se produit principalement chez les travailleurs utilisant des gaz fluorés ou chez des patients anesthésiés avec de l'isoflurane, du sévoflurane ou encore du desflurane. Il a été démontré que les taux de fluor dans le sang et les urines augmentaient chez l'Homme après une exposition par inhalation (Lund et al. 1997), avec un pic du taux urinaire deux heures après exposition, et un retour au niveau basal après 12 à 16 heures (Collings et al. 1952).

Les cellules épithéliales des voies aériennes seraient perméables au fluor par la présence de canaux ioniques (Wilk-Blaszczak et al. 1992), et son transport pourrait se faire selon deux voies : la diffusion du fluorure d'hydrogène, ou bien la prise en charge des ions fluorures par un cotransporteur F<sup>-</sup> / H<sup>+</sup> OU F<sup>-</sup> / OH<sup>-</sup> (Gutknecht and Walter 1981).

Après inhalation, les gaz fluorés sont transportés dans la circulation sanguine où ils sont métabolisés dans le foie par les cytochromes P450 des microsomes hépatiques, aboutissant ainsi à la formation d'ions fluorures (McIvor 1990; Odin and Nathan 2005; VanDyke 1979).

Une fois absorbé, le fluor est rapidement excrété dans les urines et les fèces, avec 85 à 90% du total excrété retrouvé dans les urines sur les 7 jours suivants une exposition de 4h, à des concentrations de fluorure de sulfuryle comprises entre 30 et 300 mg/L (Mendrala et al. 2005). Après inhalation, le fluor se retrouve principalement dans les poumons, la rate, les reins, les cornets nasaux mais également le cerveau, la peau et le foie (Mendrala et al. 2005).

### c. La voie percutanée

Après contact avec une peau lésée, le fluor peut entrer dans l'organisme par voie sous-cutanée. Or lors d'une exposition au fluorure d'hydrogène, présent dans des produits ménagers ou dans des domaines industriels (semi-conducteurs, pesticides, plastiques,...), la peau se retrouve exposée à des ions fluorures, causant une destruction tissulaire à forte concentration (McKee et al. 2014; Shewmake and Anderson 1979; Tepperman 1980). De la même manière que pour les personnes ayant ingéré une forte quantité de NaF, il est possible de procéder à une infiltration sous-cutanée de gluconate de sodium chez les personnes brûlées au fluorure d'hydrogène, afin de neutraliser l'ion fluorure responsable de la destruction de la peau, et de diminuer sa toxicité (Lukinuk et al. 1997).

## 2. Distribution

Quelle que soit la voie d'entrée du fluor, celui-ci passe à la circulation sanguine et se distribue dans l'organisme entier. La plus grosse partie s'accumule dans les zones riches en calcium, tels que les os et les dents. En effet, les ions fluorures ont une forte affinité avec l'apatite et de ce fait peuvent remplacer les composés hydroxydes de l'hydroxyapatite de calcium présents dans les os (McCann and Bullock 1957; Neuman et al. 1950). Par conséquent, 99% du fluor présent dans l'organisme est associé aux tissus calcifiés. L'accumulation du fluor dans ces tissus est inversement proportionnelle à l'âge de la personne exposée (Whitford 1990), avec environ 55% du fluor absorbé qui s'accumule chez les enfants, contre 36% chez l'adulte (Villa et al. 2010). Cette différence provient majoritairement de la dynamique impliquée dans le développement osseux chez les enfants, favorisant la rétention de fluor dans les tissus calcifiés.



Le fluor ne s'accumule que très peu dans les tissus mous, avec un ratio tissu/sang compris entre 0.4 et 0.9 (Whitford et al. 1979). La proportion de fluor retrouvé dans le cerveau ne dépasse généralement pas les 10%, en comparaison à la concentration sanguine de fluor (Whitford et al. 1979), tandis qu'une plus grosse fraction du fluor absorbé est retrouvée dans les tubules rénaux, dépassant souvent la concentration plasmatique (ATSDR. 2003).

### *3. Rétention et élimination*

La quasi-totalité de l'élimination du fluor se produit par la voie urinaire, après filtration rénale. Environ 10% du fluor ingéré n'est pas absorbé et est excrété dans les fèces chez des personnes ayant un régime alimentaire dit « normal ». En revanche, chez les personnes ayant un régime alimentaire riche en calcium, l'élimination du fluor peut représenter jusqu'à 25% de la dose ingérée (O'Mullane et al. 2016).

Il existe différents facteurs pouvant faire varier le taux d'excrétion urinaire du fluor. Le débit urinaire favorise son élimination (Ekstrand 1978; Ekstrand et al. 1982), tandis qu'une chute du débit de filtration glomérulaire réduit son excrétion rénale (ATSDR. 2003; O'Mullane et al. 2016). Cependant, le pH urinaire est le principal facteur faisant varier l'élimination du fluor dans les urines. En effet, une diminution du pH dans les urines induit la formation de fluorure d'hydrogène, dont la diffusion à travers l'épithélium tubulaire est plus facile que celle des ions fluorures. Ainsi le fluorure d'hydrogène est transporté jusqu'au fluide interstitiel dont le pH est neutre, et va ainsi se dissocier en ions fluorures et protons qui seront enfin redistribués dans la circulation systémique (Whitford et al. 1976).

### *C. Effets sanitaires*

Bien qu'il ait été établi par les institutions de la santé qu'une exposition prolongée à de faibles concentrations de fluor n'induisait pas d'effets pathologiques chez l'homme, de nombreuses études récentes ont démontré qu'il existe des limites de doses et de durée d'exposition au-dessus desquelles des effets délétères peuvent apparaître.

#### *1. Toxicité aiguë*

La toxicité du fluor est due d'abord à la perturbation de l'équilibre électrolytique, principalement l'hypocalcémie, mais aussi l'hypomagnésémie, l'hyperkaliémie, l'acidose, ou encore la fluorose, pouvant induire une IR, hépatique ou cardiaque (McIvor 1987; McKee et al. 2014; Sanz-Gallen et al. 2001).

Une toxicité aiguë peut survenir après une ingestion rapide d'une forte quantité de fluor, bien que l'ingestion d'une dose létale reste rare. La dose de 35 à 70 mg/kg de poids corporel est considérée comme létale après ingestion chez l'Homme, ce qui représente environ 5 à 10 g de NaF pour un adulte de 70 kg, et environ 1 à 2 g de NaF pour un enfant de 15 kg (McIvor 1990; Mellberg and Ripa 1983; Whitford 2011b). Cependant, la dose considérée comme étant « probablement toxique » est de 5 mg/kg de poids corporel, nécessitant une intervention thérapeutique et une hospitalisation (Whitford 1990).



Les symptômes de l'ingestion d'une trop forte quantité de fluor se manifestent rapidement et sont représentés par une sensation de soif, un excès de salivation et des douleurs abdominales accompagnées de diarrhées et de vomissements (Whitford 1996, 2011b).

### *2. Toxicité chronique : la fluorose*

L'exposition chronique au fluor se fait principalement par l'eau de boisson et l'ingestion d'aliments contaminés, et sa principale conséquence sur l'organisme est la fluorose (DenBesten and Li 2011). Il existe plusieurs formes de fluorose, notamment la fluorose dentaire et la fluorose squelettique. La fluorose dentaire a été associée à des niveaux de fluor supérieurs à 1.5 mg/L dans l'eau de boisson, tandis que la fluorose squelettique a été associée à des niveaux de fluor supérieurs à 10 mg/L. Aujourd'hui, il est estimé que plus de 260 millions de personnes consomment une eau de boisson dont les concentrations en fluor dépassent 1 mg/L (WHO 2006).

#### *a. Fluorose squelettique*

L'exposition à une concentration élevée de fluor peut provoquer une fluorose squelettique accompagnée de l'apparition de douleurs articulaires chroniques, de la calcification des ligaments, d'ostéosclérose et d'une éventuelle ostéoporose des os longs (Dhar and Bhatnagar 2009).

Les ions fluorures ont une forte affinité avec l'apatite et ont tendance à remplacer les composés hydroxydes de l'hydroxyapatite de calcium (McCann and Bullock 1957; Neuman et al. 1950). Une fois formée, l'apatite/fluorhydroxyapatite reste stable chimiquement, et les ions fluorures ne disparaissent qu'après la résorption naturelle du tissu calcifié, lors du processus de remodelage osseux. En formant la fluorapatite, le fluor a le potentiel d'accroître la minéralisation osseuse, et de ce fait, certains chercheurs y avaient vu la possibilité d'utiliser le fluor comme une base de traitement ou de prévention contre l'ostéoporose. Cependant, des études menées pour voir si le fluor pouvait diminuer l'incidence d'ostéoporose post-ménopausique n'ont pas démontré de réduction significative de l'apparition de fractures osseuses vertébrales (Maclaughlin et al. 2006). De plus, il a été conclu que des expositions à des taux de fluor élevés dans l'eau de boisson n'induisaient pas de réduction des problèmes de santé osseux (Hillier et al. 2000; McDonagh et al. 2000; Nasman et al. 2013; Phipps et al. 2000). À l'inverse, une revue a cherché à savoir si une exposition chronique aux eaux fluorées pouvait augmenter l'apparition de fractures osseuses dans la population, démontrant qu'il n'y avait pas d'effets aux concentrations auxquelles la population était exposée (RSNZ and PMCSA 2014).

Cependant, plusieurs millions de personnes sont exposées au risque de fluorose osseuse invalidante, principalement en Inde et en Chine (Fawell et al. 2006). Une étude a observé une augmentation de l'apparition d'ostéosarcome chez de jeunes hommes adultes exposés au fluor durant leur enfance (Bassin et al. 2006), mais ces résultats n'ont pas été confirmés par une étude menée sur une cohorte plus récente, où le fluor avait été mesuré directement dans les os prélevés sur des patients (Kim et al. 2011). Des études irlandaise et anglaise ont également démontré qu'il n'y avait pas de différence d'incidence d'ostéosarcome chez les populations vivant dans les régions où l'eau de boisson est fluorée, et chez les populations vivant dans les régions où l'eau de boisson n'est pas fluorée (Blakey et al. 2014; Comber et al. 2011).



### b. Fluorose dentaire

Durant les années 1930, des chercheurs ont tenté de comprendre pourquoi certaines personnes, habitant dans les zones dont l'eau de boisson avait été fluorée, présentaient des dents teintées de brun. Une des régions étudiées était le Colorado, d'où l'appellation de ce phénomène : le « Colorado Brown Stain », qui sera en fait identifié plus tard comme une forme de fluorose dentaire avancée.

Durant la formation dentaire, le fluor s'incorpore dans la structure et se dépose à la surface des dents. C'est ainsi qu'il est supposé que le fluor lutterait contre l'apparition de caries dentaires (Newbrun 1986). Cependant, de nombreuses études menées sur l'Homme et sur des modèles animaux ont démontré qu'une exposition chronique à des taux de fluor trop élevés résultait dans l'apparition de fluorose dentaire (ATSDR. 2003; Mascarenhas 2000).

## D. Organotoxicité

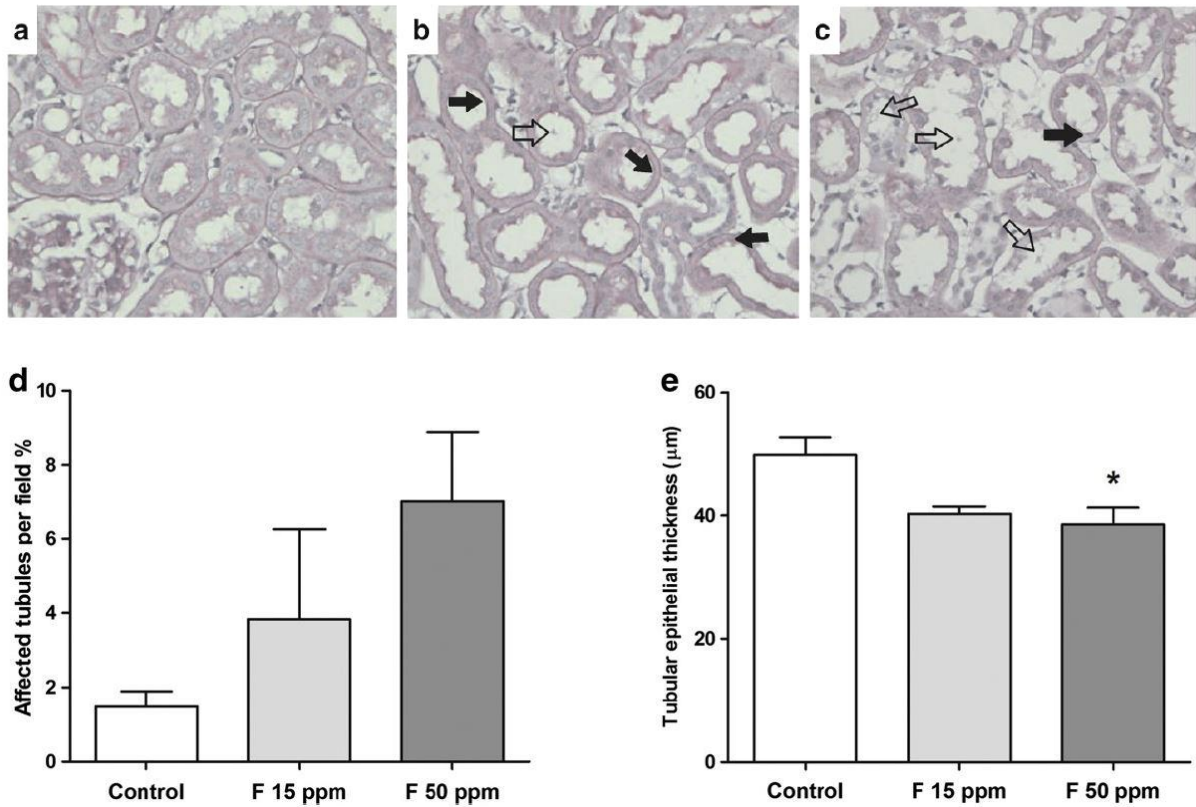
### 1. Néphrotoxicité

#### a. Données épidémiologiques

Bien que la consommation d'eau de boisson avec une teneur optimale en fluor n'augmente pas le risque de développer une IRC, plusieurs études démontrent qu'à de fortes concentrations, le fluor peut être néphrotoxique. Une étude épidémiologique réalisée en Inde a démontré une modulation des taux de calcium, sodium et potassium dans le sang d'une population exposée à des concentrations de fluor supérieures aux recommandations (1 à 6.53 mg/L), indiquant ainsi un déséquilibre de la balance électrolytique et une altération de la fonction rénale (Michael et al. 1996). Il a été mis en évidence que le fluor pouvait induire une IRC lors de la consommation d'eau de boisson contenant en moyenne 8.5 mg/L de fluor (Lantz et al. 1987), avec notamment une inhibition de l'acide phosphatase, une enzyme marqueur de la fonctionnalité rénale (Partanen 2002). Khandare *et al.* suspectent qu'une altération de la fonction tubulaire soit associée à une exposition environnementale au fluor (Khandare et al. 2017). En effet, des dommages de l'épithélium tubulaire, une lyse et vacuolisation cellulaire, ainsi que de la nécrose et de l'apoptose ont été observées dans les biopsies rénales de patients ayant eu des syndromes néphrotiques durant l'enfance et possédant un taux élevé de fluor dans les urines de 4.01 mg/L (soit environ 6.5 fois la concentration basale de 0.61 mg/L) (Quadri et al. 2018b).

Des études ont démontré que le fluor pouvait induire des dommages tubulaires dans les reins d'enfants exposés à des eaux de boisson concentrées à plus de 2 mg/L en Chine. En effet, ces enfants présentaient une concentration urinaire élevée des marqueurs de dommages tubulaires : NAG et  $\gamma$ GT (Schiffel 2008; Xiong et al. 2007). Une autre étude a confirmé ces résultats en démontrant qu'une exposition à plus de 2 mg/L de fluor pouvait causer des dommages rénaux dose-dépendants chez les enfants (Liu et al. 2005). Comme expliqué précédemment, les enfants ont tendance à avoir une absorption plus importante du fluor dans leur organisme (Ekstrand et al. 1994a), et ce phénomène pourrait s'expliquer par le fait que les enfants aient une altération de leur capacité d'excrétion du fluor (Liu et al. 2005). Par conséquent, les sujets exposés à de fortes concentrations de fluor dans l'eau de boisson ou la nourriture durant leur enfance ont une rétention plus importante du fluor dans leur organisme, pouvant ainsi fragiliser leurs reins et les rendre plus sensibles à l'apparition de pathologies rénales dans leur vie adulte. Ces mécanismes expliqueraient qu'aucun effet rénal





**Figure 18: Dommages tubulaires rénaux induits dans le rein par une contamination chronique au fluor chez le rat**

Les rats sont exposés *per os via* une eau de boisson contaminée à 15 et 50 mg/L de fluor. Des images représentatives de coupes rénales colorées par la méthode PAS (periodic acid-Schiff) sont montrées au grossissement 400x pour des animaux contaminés avec 0 (a), 15 (b) et 50 mg/L de fluor (c). Les flèches pleines représentent un aplatissement tubulaire tandis que les flèches vides représentent le décollement des cellules tubulaires. Le pourcentage de tubules altérés (d) et la mesure en  $\mu\text{m}$  de l'épaisseur de l'épithélium tubulaire (e) sont représentés en tant que moyenne  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$ . Source : Cardenas-Gonzalez *et al.* 2013

délétère n'ait pu être corrélé à une exposition chronique à de faibles concentrations de fluor, allant de 1 à 2 mg/L chez l'adulte. Cependant, la plupart des études ne prennent en compte que l'exposition due à la teneur en fluor de l'eau de boisson, tandis qu'une forte exposition est également due aux produits d'hygiène bucco-dentaire, à la nourriture, aux médicaments, ou encore à l'exposition aux pesticides (Xiong et al. 2007).

Tous ces résultats mis bout à bout, en association avec les études expérimentales, démontrent le potentiel néphrotoxique du fluor, et laissent supposer qu'un apport excessif en fluor pourrait mener à des dommages rénaux menant en aval à une IRC.

### b. Données expérimentales

Après traitement au fluor, des études *in vitro* ont montré une cytotoxicité induite chez les cellules humaines de TCP (HK-2) (Zager and Iwata 1997), et des atteintes mitochondriales ont été observées dans des cellules du tube collecteur (Cittanova et al. 1996). *In vivo*, une sévère altération structurelle du rein a été observée chez des souris traitées de 15 à 150 mg/L au fluor durant 30 à 90 jours (Chattopadhyay et al. 2011). Ces résultats ont été confirmés chez le rat, dans différents modèles d'exposition présentant une dysfonction et une dégénération rénale (Dote et al. 2000b; Zabulyte et al. 2007), avec une dilatation de l'anse de Henlé (Lindemann et al. 1959; Pindborg 1957), ainsi qu'une détérioration des cellules épithéliales tubulaires (Karaoz et al. 2004; Navathej et al. 2015) qui présentent de la nécrose (Kour and Singh 1980; Taylor et al. 1961).

Un déséquilibre ionique, associé à une dysfonction de la pompe Na-K-ATPase et à une diminution de l'activité ATPase dans la mitochondrie des cellules rénales, est induit chez des rats exposés oralement à 50 mg/kg de fluor (Suketa and Mikami 1977). Ces résultats ont été confirmés *in vitro* par Cittanova et al. (2002) qui ont démontré que la pompe Na-K-ATPase était bien une cible de la toxicité du fluor dans la région de l'anse de Henlé (Cittanova et al. 2002).

L'induction du stress oxydatif est un mécanisme de toxicité connu du fluor (Barbier et al. 2010). De nombreuses études ont démontré que le fluor induisait un stress oxydatif rénal chez le lapin, ou d'autres rongeurs exposés de manière chronique, à des concentrations allant de 25 à 200 mg/L (Ranjan et al. 2009; Shanthakumari et al. 2004). Ce dernier est alors capable de moduler la balance redox intracellulaire, induisant ainsi de la peroxydation lipidique, et pouvant mener à l'apoptose des cellules rénales (Barbier et al. 2010; Xu et al. 2006). Ce stress oxydatif a été associé à une augmentation des TBARS (thiobarbituric acide reactive substances) et à une diminution de taux de GSH, ainsi que des expressions et des activités des enzymes antioxydantes SOD, GPX et CAT (Chattopadhyay et al. 2011; Chouhan and Flora 2008; Mittal and Flora 2006; Ranjan et al. 2009; Shanthakumari et al. 2004).

### c. Localisation des dommages rénaux

Des observations histopathologiques faites chez le rat (**figure 18**) ont permis de localiser la majorité des lésions induites par le fluor dans la région des TCP, et non pas dans la région glomérulaire (Cardenas-Gonzalez et al. 2013; Usuda et al. 1998). Cardenas et al. (2013) ont démontré qu'une exposition chronique à 15 et 50 mg/L de fluor chez le rat pendant 40 jours induisait des biomarqueurs précoces et spécifiques de la région tubulaire, tel que KIM-1 (Cardenas-Gonzalez et al. 2013). Chez des rats traités avec une dose unique de 135 mg/kg, une augmentation du taux de  $\alpha$ -GST



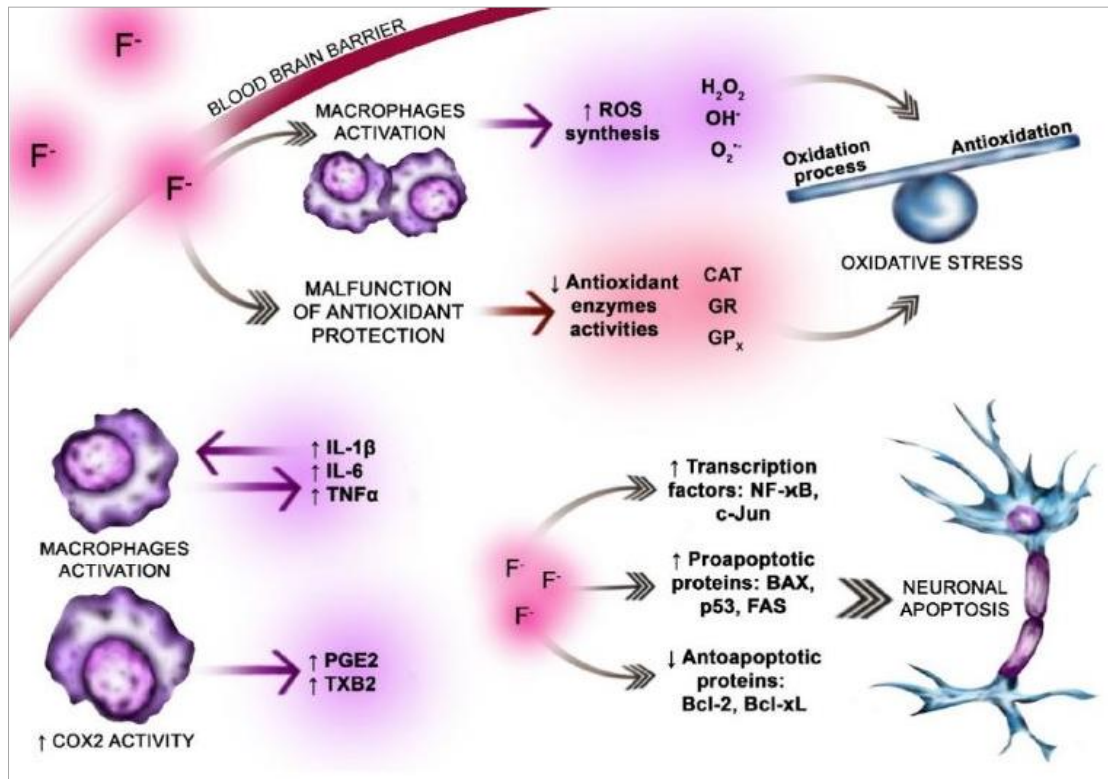
a été mise en évidence. Ce marqueur est spécifique du segment S3 des TCP, également appelé la « pars recta », du latin pour signifier la partie droite des TCP, qui se termine dans la zone médullaire. Ainsi, ces résultats semblent indiquer une toxicité et des dommages structuraux induits par le fluor dans le rein, et plus spécifiquement dans le segment S3. En effet, Chattopadhyay *et al.* ont également observé des effets délétères au niveau histologique, avec une dégradation de l'épithélium tubulaire, mais avec aussi des dommages glomérulaires (Chattopadhyay *et al.* 2011).

#### d. Des effets adaptatifs face à une exposition chronique à de faibles doses ?

Bien que le fluor soit connu pour être néphrotoxique à fortes doses, les effets induits par une exposition chronique à faibles doses semblent démontrer la mise en place de mécanismes adaptatifs. En effet, Cardenas-Gonzales *et al.* (2016) ont démontré qu'une préexposition à des doses infra-néphrotoxiques de fluor (15 et 50 mg/L) pendant 40 jours diminuait la néphrotoxicité induite par un second traitement à la gentamicine chez le rat (Cardenas-Gonzalez *et al.* 2016). Ils ont démontré que la préexposition au fluor rétablissait un débit de filtration glomérulaire plus proche de la normale, et réduisait l'expression des biomarqueurs de néphrotoxicité KIM-1, CLU, OPN, B2MG et cys-C induite par la gentamicine. Après une exposition similaire de 15 mg/L de fluor durant 30 jours, des souris ont présenté une augmentation de l'activité de la GST dans le rein, indiquant l'activation d'une défense antioxydante (Chattopadhyay *et al.* 2011). Cette défense antioxydante a d'ailleurs été mise en évidence dans le foie de poissons zèbres exposés à la même concentration de 15 mg/L (Mukhopadhyay and Chattopadhyay 2014; Mukhopadhyay *et al.* 2015b). Les auteurs ont mis en évidence une induction génique des protéines GST, CAT, SOD, GPX, associée à une activation de l'expression de Nrf2 et une diminution de l'expression de Keap1. De plus, des résultats similaires sur les expressions de Nrf2 et de Keap1 ont été obtenus dans le cerveau du même modèle d'exposition (Mukhopadhyay *et al.* 2015a), suggérant l'implication de la voie Nrf2 dans cette réponse antioxydante face à de faibles doses de fluor.

Les heat shock protein (Hsp) sont des protéines chaperonnes induites en cas de stress cellulaire et garantissant la bonne conformation des protéines dans la cellule. Une induction de la protéine Hsp70 a été observée dans des reins de souris exposées à 15 mg/L de fluor durant 30 jours (Chattopadhyay *et al.* 2011) et ces résultats ont été confirmés avec l'induction de la protéine cytoprotectrice Hsp72 lors d'une préexposition de 40 jours au fluor (15 et 50 mg/L) chez la souris (Cardenas-Gonzalez *et al.* 2016).

Tous ces résultats réunis semblent indiquer l'existence de la mise en place de certains mécanismes adaptatifs en réponse à une contamination chronique à de faibles doses de fluor. Cependant, des taux élevés de peroxydation lipidique ont été constatés dans le rein de rats exposés à 30 et 100 mg/L de fluor dans l'eau de boisson durant 7 mois, indiquant l'induction d'un stress oxydatif (Guan *et al.* 2000). En effet, comme observés avec d'autres xénobiotiques, les mécanismes adaptatifs de défense mis en place lors d'une exposition chronique à faible dose au fluor sont sûrement surpassés à partir d'une certaine dose et/ou d'une certaine durée d'exposition.



**Figure 19 : Résumé de la neurotoxicité induite par le fluor**

Les ions fluorures passent la barrière hémato-encéphalique facilement. Une fois entré dans le système nerveux, le fluor influe sur le métabolisme des neurones et des cellules gliales. Il induit un stress oxydatif par la formation d'ERO (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, OH<sup>-</sup> et O<sub>2</sub><sup>-</sup>), notamment *via* l'activation de macrophages et par l'inhibition des activités des enzymes antioxydantes (SOD, CAT, GPx et GR). Le fluor est également responsable d'une neuro-inflammation cérébrale, avec une stimulation de la synthèse de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TNF-α et IFN-), pouvant ainsi mener à une neurodégénérescence et à de l'apoptose. Source : Goschorska *et al.* 2018a

## 2. Neurotoxicité

### a. Dommages induits sur la plasticité synaptique et la neurogenèse

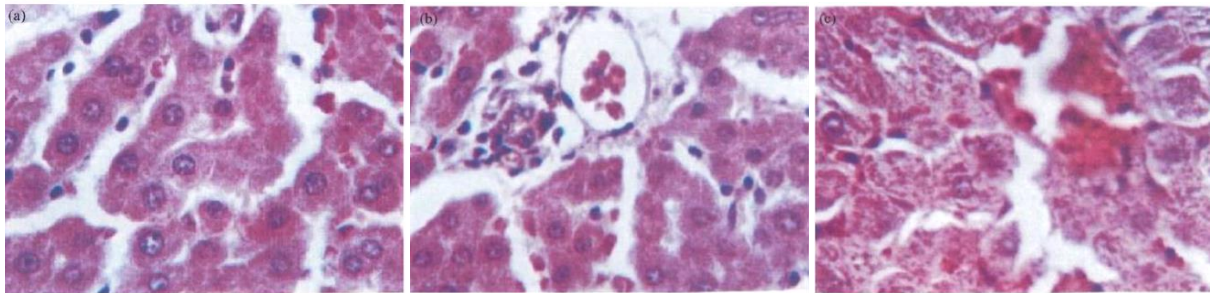
De fortes doses de fluor sont capables d'induire une réduction significative du nombre de neurones, et plus spécifiquement des cellules de Purkinje (Basha and Saumya 2013). De plus, de nombreux effets ultrastructuraux ont été révélés, incluant des dommages mitochondriaux, la dilatation du RE, la disparition de dendrites, la rupture de microtubules axonaux, et une augmentation de la densité dans la région dense postsynaptique (Guan et al. 1998; Niu et al. 2018; Niu et al. 2015; Qian et al. 2013). De nombreuses études ont mis en évidence l'induction d'une mort cellulaire neuronale chez des modèles exposés au fluor, avec notamment l'induction de stress oxydatif et d'apoptose (Bharti and Srivastava 2009; Flora et al. 2009; Goschorska et al. 2018a; Zhang et al. 2007) et de dommages à l'ADN (Zhang et al. 2008). Ces mécanismes peuvent être à l'origine des effets ultrastructuraux observés, et affectent la structure neuronale synaptique ainsi que la plasticité synaptique et la neurogenèse. De plus, il a récemment été démontré que le fluor peut induire une suppression de l'autophagie chez des cellules humaines de neuroblastomes, privant ainsi les cellules de ce système de défense connu pour être impliqué dans la réponse adaptative (Tang et al. 2017). Le fluor serait également capable d'induire des altérations de la capacité d'adhésion des neurones. La protéine NCAM (Neural Cell Adhesion Molecule) est majoritairement impliquée dans les processus de migration neuronale et de formation synaptique. Une étude a démontré que ses expressions génique et protéique diminuaient, aussi bien *in vitro* dans des cellules neuronales primaires issues de l'hippocampe de rats (Zhang et al. 2007), qu'*in vivo* chez la souris (Niu et al. 2018). Tous ces résultats confirment bien que le fluor induit une cytotoxicité des neurones dans de nombreux modèles.

De plus, à de fortes concentrations, il a été démontré que le fluor induisait une diminution de l'expression génique de la protéine transmembranaire constitutive de la myéline : la PLP (proteolipid protein) et une augmentation de la concentration de MAG (myelin-associated glycoprotein), une protéine naturellement libérée par la myéline lorsque celle-ci est endommagée (Niu et al. 2018). Ces résultats indiquent qu'à fortes doses le fluor induit des dommages à la gaine de myéline présente dans le système nerveux central et périphérique, diminuant ainsi l'efficacité de la transmission des signaux entre les synapses et les neurones.

### b. Neuro-inflammation

Les effets neurotoxiques associés au fluor sont notamment provoqués par une activation de la microglie et l'induction d'une neuro-inflammation (Goschorska et al. 2018a; Yan et al. 2016). En effet, il a été démontré que le fluor pouvait induire une activation des cellules murines microgliales BV-2 (Chen et al. 2017; Shuhua et al. 2012), et il est suspecté que cette neuro-inflammation soit induite par la voie NFκB (Chen et al. 2017; Zhang et al. 2011). Yan *et al.* (2016) ont mis en évidence une activation de la microglie plus importante dans la région hippocampique que dans le cortex cérébral, chez les rats exposés aux doses de 60 et 120 mg/L de fluor sur une période de 10 semaines (Yan et al. 2016).

Tel que résumé en **figure 19**, l'ensemble de ces résultats montrent que le fluor est capable de pénétrer le système nerveux et d'induire un stress oxydatif ainsi qu'une inflammation, affectant les cellules neuronales et microgliales. Ces mécanismes peuvent mener à de la neurodégénérescence, signe de la neurotoxicité du fluor (Goschorska et al. 2018a).



**Figure 20 : Lésions histopathologiques du tissu hépatique après exposition chronique au fluor**

Les images sont représentatives des lésions histologiques observées chez des rats exposés oralement à 0 (a) et 25 mg/L de fluor (b) pendant 8 semaines. Les animaux exposés au fluor montrent des signes d'inflammation, d'infiltrats cellulaires et de nécrose focale. Lors d'une exposition de 16 semaines (c), les hépatocytes des animaux exposés sont gonflés et nécrosés. Source : Shanthakumari *et al.* 2004

### 3. Toxicité sur la thyroïde

Lors d'une étude épidémiologique, une augmentation de l'hormone thyroïdienne T4 a été observée chez une population en Inde, exposée à des concentrations de fluor supérieures aux recommandations en vigueur, indiquant alors une altération de la fonction thyroïdienne (Michael et al. 1996). Des effets histopathologiques ont été observés sur la thyroïde des poissons zèbres exposés au fluor, avec un effet dose dépendant (Jianjie et al. 2016). Dans divers modèles, il a été démontré que le fluor pouvait moduler les expressions géniques des déionidases Dio1, Dio2 et Dio3, qui sont des protéines impliquées dans la conversion des hormones T4 (thyroxine) en T3 (triiodothyronine), et pouvant réguler leur état d'activation (Jianjie et al. 2016; Zhang et al. 2018). De plus, une modulation des expressions géniques des protéines CRH (corticolibérine), TSH (thyroïdostimuline), NIS (transporteur Na/I) et TG (précurseur à la thyroglobuline) impliquées dans le cycle de production des hormones thyroïdiennes a été mise en évidence chez le poisson zèbre après une exposition au fluor (Jianjie et al. 2016). Ainsi, il a été constaté une diminution allant jusqu'à plus de 57 % de l'hormone T3 sérique, ainsi que de l'hormone T4 chez des rats exposés au fluor (Basha et al. 2011; Sarkar and Pal 2014). Le même effet a été observé chez des têtards de *bufo gargarizans* (Zhao et al. 2013), tandis que chez le poisson zèbre il a été démontré que le fluor induisait une diminution de la T4 après 90 jours d'exposition mais également une augmentation de la T3 durant toute la période d'exposition (Jianjie et al. 2016). Le fluor est donc capable de modifier les concentrations en hormones thyroïdiennes, et ce, dans différents modèles.

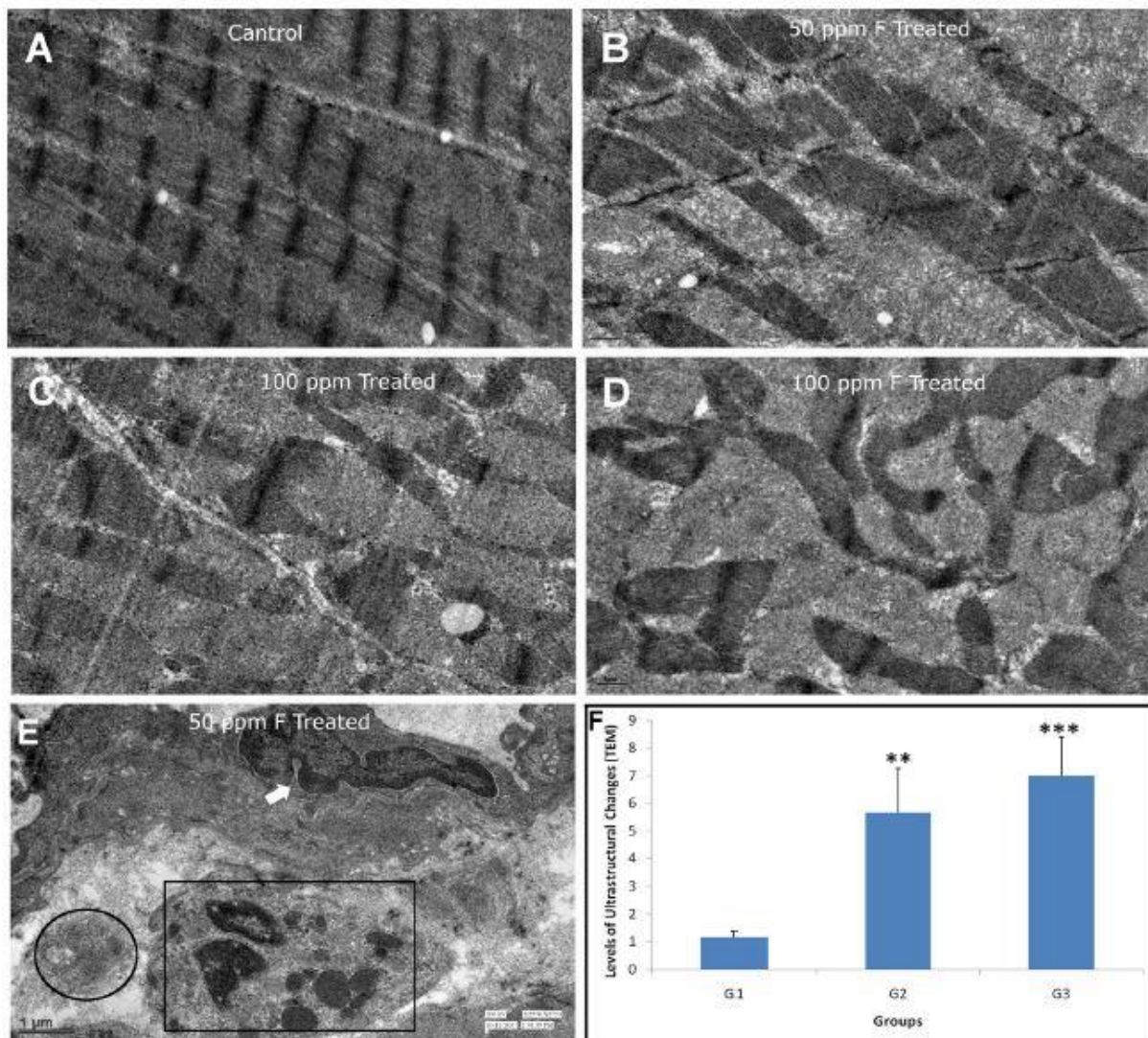
De plus, le fluor module les expressions géniques des deux isoformes  $\alpha$  et  $\beta$  du récepteur aux hormones thyroïdiennes (HT), chez le crapaud asiatique et chez le poisson zèbre, pouvant ainsi induire un arrêt du cycle cellulaire ou une sénescence cellulaire (Jianjie et al. 2016; Zhang et al. 2018). Tous ces résultats combinés indiquent que le fluor est capable de moduler les concentrations en hormones thyroïdiennes, ainsi que l'expression de ses récepteurs, pouvant ainsi provoquer une altération de la fonction thyroïdienne.

### 4. Hépatotoxicité

Des études épidémiologiques menées au sein d'une cohorte indienne ont démontré qu'une exposition au fluor pouvait induire une augmentation du taux sanguin de transaminases, indiquant alors une altération de la fonction hépatique (Michael et al. 1996). Des dommages structuraux ont été observés sur des foies de rats exposés *per os* à 25 mg/L de fluor durant 8 semaines (**figure 20**) et de lapins exposés à des doses de 50 à 200 mg/L de fluor pendant 90 jours (Shanthakumari et al. 2004 ; Ranjan et al. 2009). Ces altérations ont été mises en corrélation avec l'induction d'un stress oxydatif, mis en évidence par une peroxydation lipidique et une diminution des activités de certaines enzymes antioxydantes (Ranjan et al. 2009). Cette réduction de l'activité d'enzymes antioxydantes dans le foie a également été mise en évidence chez des rats exposés à une eau de boisson contaminée à 25 mg/L de fluor durant 8 à 16 semaines (Shanthakumari et al. 2004). De plus, le foie de rats exposés entre 2 à 8 semaines à 100 mg/L de NaF présente des ruptures de l'intégrité de l'ADN, avec un pic à 4 semaines (Liang et al. 2018).

Il a été démontré *in vitro* que le fluor pouvait en effet induire un stress oxydatif, mais également de l'apoptose et de la nécrose ainsi que des dommages à l'ADN aussi bien sur des cellules hépatiques humaines que sur des cellules murines (Ghosh et al. 2008; He and Chen 2006; Wang et al. 2005; Wang et al. 2004) ; confirmant ainsi les résultats cités ci-dessus.





**Figure 21 : Dommages structuraux induits le fluor dans le tissu cardiaque de rat**

Images représentatives de tissus cardiaques obtenues par microscopie électronique à transmission chez des rats exposés durant 75 jours à 0, 50 ou 100 mg/L de fluor. Les animaux non exposés ont une structure normale et une répartition uniforme des cellules cardiaques, avec des lignes Z bien droites (A), tandis que les animaux exposés à 50 mg/L de fluor ont des sarcomères non uniformes (B). Les effets semblent dose-dépendants puisque cette hétérogénéité et cette asymétrie sont plus prononcées chez les animaux exposés à 100 mg/L (C). On constate une segmentation des fibres musculaires et une distorsion des lignes Z dans le tissu des animaux exposés à 100 mg/L (D), tandis que les animaux exposés à 50 mg/L montrent des signes d'infiltrats inflammatoires (flèche blanche), d'apoptose (rectangle noir) et de dépôts calciques (cercle noir) (E). Un score moyen des changements dans l'ultrastructure des tissus cardiaques est calculé pour chaque groupe (F). Source : Quadri *et al.* 2018a

## 5. Reprotoxicité

En épidémiologie, la comparaison de deux cohortes, l'une servant de contrôle et buvant de l'eau de boisson avec une concentration en fluor inférieure à 1 mg/L, et l'autre buvant une eau avec 3.89 mg/L de fluor depuis plus de 5 ans, a permis d'identifier le fluor comme un agent responsable de troubles endocriniens (Hao et al. 2010). En effets, des modulations hormonales pouvant conduire à des perturbations de la capacité reproductrice ont été mises en évidence, avec notamment une élévation du taux de LH sérique accompagné d'une diminution du taux de testostérone chez les hommes, et à l'inverse une augmentation du taux de testostérone sérique chez les femmes.

En recherche expérimentale, des études ont également démontré des effets délétères du fluor sur l'appareil reproducteur (Li et al. 2018; Sun et al. 2016; Zhang et al. 2017b) . L'exposition de rats à 100 mg/L de NaF dans l'eau de boisson durant deux semaines induit une dérégulation de l'expression testiculaire du cytochrome P450 et de la protéine CREM (cAMP response element modulator), induisant des troubles de la stéroïdogénèse, la spermatogénèse, et de la motilité des spermatozoïdes (Zhang et al. 2017b). En effet, des études menées sur la souris ont démontré que le fluor induisait bien une inhibition de la motilité spermatique *via* une diminution de l'hyperactivation (Sun et al. 2009) et l'apoptose des spermatozoïdes (Sun et al. 2011). Ces effets ont été, pour la majorité, associés à l'induction d'un stress oxydatif dans les testicules et le sperme (Ghosh et al. 2002; Wang et al. 2009), puisque l'on constate une amélioration des effets délétères induits par le fluor lors d'un co-traitement avec des antioxydants (Chinoy and Sharma 1998). *In vitro*, des traitements de 24 heures (5 à 20 mg/L de NaF) induisent des effets délétères sur les cellules de Leydig, avec notamment des dommages détectables sur les membranes et le cytosquelette (Li et al. 2018).

Tous ces résultats mis conjointement indiquent que le fluor peut induire une toxicité et une dérégulation du système de reproduction.

## 6. Cardiotoxicité

Une étude épidémiologique a mise en évidence la présence de marqueurs précoces d'athérosclérose, en relation avec une exposition chronique au fluor. Ainsi, chez une population pédiatrique de 5 à 12 ans de l'état de Chihuahua au Mexique, une augmentation sérique de VCAM-1 et ICAM-1 et de l'épaisseur intima-média de la carotide a été observée et corrélée à la concentration urinaire de fluor, menant à une augmentation du risque d'atteintes vasculaires (Jimenez-Cordova et al. 2019). Expérimentalement, des dommages induits aux tissus cardiaques ont été constatés chez des rats exposés à 50 ou 100 mg/L durant 75 jours (**figure 21**) (Quadri et al. 2018a). Les auteurs ont observé une induction de stress oxydatif, d'apoptose, ainsi que d'inflammation dans ces tissus. Les résultats obtenus lors d'une récente étude transcriptomique laissent à penser que la cardiotoxicité induite par le fluor serait partiellement due à une régulation de la voie des TLR dans les tissus cardiaques de souris exposées à 30 et 90 mg/L de NaF (Yan et al. 2019).



### E. Mécanismes impliqués dans la toxicité du fluor

#### 1. Mécanismes moléculaires et voies de signalisation impliqués dans la toxicité du fluor

##### a. Les dommages mitochondriaux

Des dommages mitochondriaux ont été observés chez des animaux exposés au fluor, avec l'apparition d'œdèmes, ainsi que d'altérations et de vacuolisation de la membrane mitochondriale (Quadri et al. 2018a; Sun et al. 2011; Sun et al. 2016). Les dommages mitochondriaux sont généralement induits par des événements moléculaires tels qu'une altération de la chaîne de transport des électrons (CTE) et la chute du potentiel membranaire (PM), associés à une diminution de la synthèse d'ATP.

Quelques études ont démontré que le fluor pouvait altérer la CTE et induire une chute du PM, menant éventuellement à l'apoptose, tel que cela a été observé dans les reins de souris traitées avec 12, 24 et 48 mg/kg de NaF pendant 42 jours (Wei et al. 2018). EMT-Cytb (mitochondrial cytochrome b) est une sous-unité de la chaîne respiratoire ubiquinol cytochrome c réductase (complexe mitochondriale III) et mt-COX2 (mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 2) est une enzyme impliquée dans le complexe mitochondrial IV de la CTE. L'expression génique de mt-Cytb et mt-COX2 est diminuée dans le sperme de souris exposées durant 90 jours à des concentrations allant de 25 à 100 mg/L de NaF, indiquant ainsi une altération de la fonction de la CTE, et très probablement à un stress oxydatif (Sun et al. 2016). Les protéines UCP (mitochondrial uncoupling protein) jouent également un rôle essentiel dans le bon fonctionnement de la CTE, or la protéine UCP2 est significativement induite chez des rats exposés à 50 et 100 mg/L de fluor (Suzuki et al. 2014). De plus, une diminution du taux d'ATP issu de la respiration mitochondriale a été observée dans le sperme de souris exposées à la forte concentration de 100 mg/L de NaF dans l'eau de boisson pendant 90 jours (Sun et al. 2016). Ce mécanisme a été confirmé *in vitro* dans une lignée d'améloblastes humains soumise à un traitement de 6 heures à 5 mM induisant, non seulement une production d'UCP2, mais également une chute du potentiel membranaire, associée à une diminution de la synthèse d'ATP (Suzuki et al. 2015).

##### b. Les voies Nrf2, NFκB et Wnt

La voie Nrf2 est une voie impliquée dans la réponse de la cellule face à l'induction d'un stress oxydatif. La protéine Keap1 forme un complexe avec le facteur de transcription Nrf2 et empêche la translocation de ce dernier au noyau, où il induit la transcription de gènes impliqués dans la réponse antioxydante (SOD, CAT, GPX). Des études menées dans le contexte des faibles doses de fluor ont démontré que cette voie pouvait être induite chez le poisson zèbre après une exposition à 15 mg/L. En effet, une induction de l'expression de Nrf2 et une diminution de l'expression de Keap1 ont été observées dans le foie (Mukhopadhyay et al. 2015b), et peuvent ainsi expliquer la diminution de la transcription de GST, CAT, SOD et GPX observée dans le même modèle (Mukhopadhyay and Chattopadhyay 2014). Bien qu'une induction d'ERO ait été observé dans le cerveau de poissons zèbres exposés à 15 mg/L de fluor, la voie antioxydante Nrf2 semble être stimulée à travers les régulations géniques de Keap1 et de Nrf2 (Mukhopadhyay et al. 2015a).

NFκB est un facteur de transcription jouant un rôle majeur dans la régulation de l'inflammation. Son activité va être régulée, dans un premier temps par la modulation de sa transcription, puis dans un

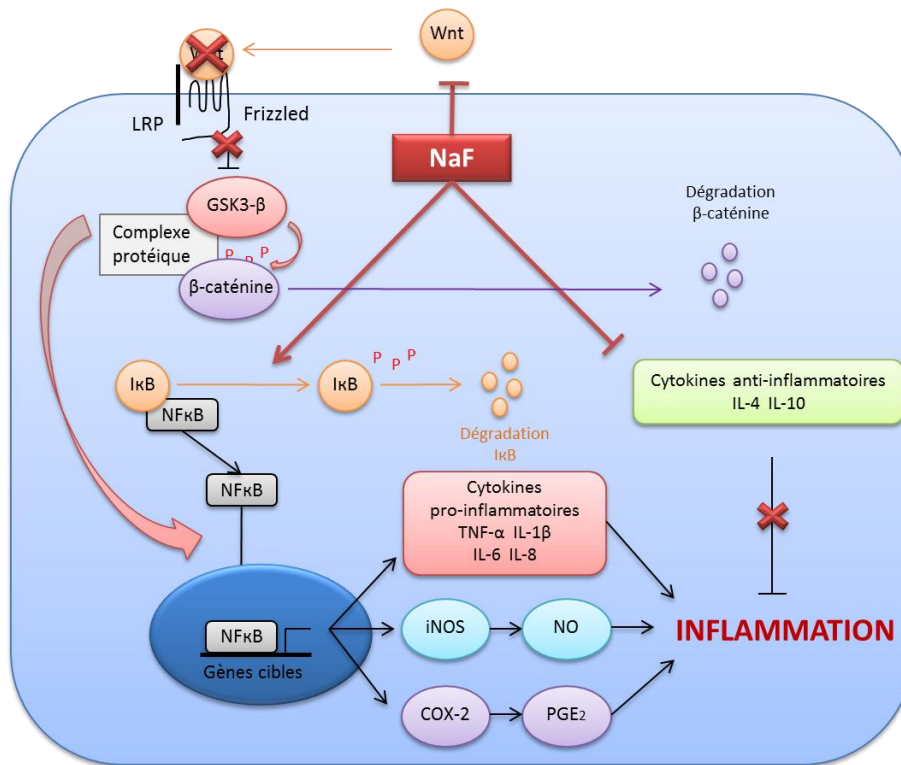


Figure 22. Modèle d'activation de la voie NFκB et de l'induction de l'inflammation dans la cellule

Schéma dressé à partir des résultats obtenus par Luo *al.* 2017 et Chen *et al.* 2017

second temps par sa translocation nucléaire, où NFκB va pouvoir moduler la transcription de ses gènes cibles. *In vitro*, l'expression génique de NFκB est induite par le fluor dans un modèle de culture primaire neuronal de rat (Zhang et al. 2008) et la translocation au noyau de la protéine dans des cellules microgliales exposées au fluor a été démontrée (Chen et al. 2017). Cette activation de la voie NFκB mène à l'activation de la microglie et permet ainsi d'identifier un des mécanismes menant à la neuro-inflammation induite par le fluor chez des modèles *in vivo*. L'activation de la voie de signalisation par la translocation au noyau de NFκB, a également été démontrée *in vivo* chez des rats exposés de manière chronique au fluor durant 9 mois, à des concentrations allant de 15 à 60 mg/L (Zhang et al. 2011). L'activation de la voie NFκB est un des événements majeurs menant à l'inflammation rénale, avec l'induction de facteurs et de cytokines pro-inflammatoires ainsi que la réduction de production de cytokines anti-inflammatoire, tel que démontré chez des souris exposées à 24 ou 48 mg/kg de fluor pendant 21 ou 42 jours (Luo et al. 2017). Dans cette étude, Luo *et al.* démontrent que le fluor active la translocation de NFκB au noyau, et donc les signaux pro-inflammatoires, à travers la dégradation de la protéine IκB.

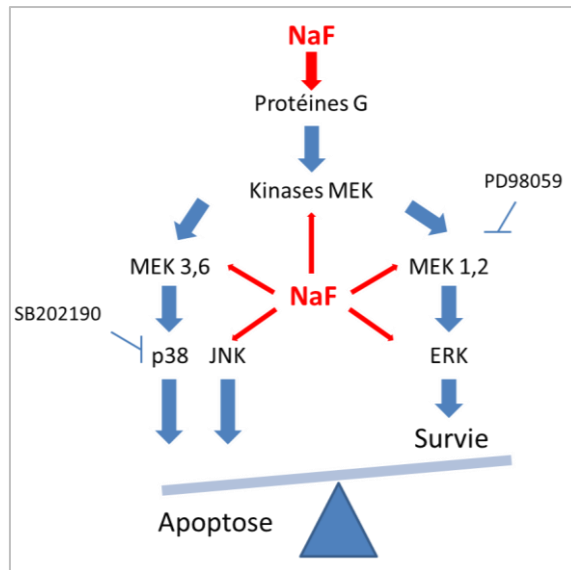
De plus, il a été démontré que le fluor pouvait agir sur la voie Wnt, induisant ainsi des effets inflammatoires (Chen et al. 2017). La voie Wnt inhibe l'activation de la GSK3β (glycogen synthase kinase-3β), réduisant ainsi la dégradation de la β-caténine par le protéasome. Ces événements mènent à une augmentation de la concentration en β-caténine dans le cytosol et à sa translocation au noyau, où elle va moduler la transcription de gènes cibles impliqués notamment dans l'apoptose, la prolifération et la migration cellulaire. Il a été mis en évidence que l'activation de la GSK3β pouvait aussi induire la voie NFκB (Die et al. 2012), menant alors à une inflammation. Chen *et al.* (2017) ont démontré que le fluor induisait une inhibition de la voie Wnt par la mesure d'une augmentation de l'activité de la GSK3β, et d'une diminution de la concentration en β-caténine. Cette inhibition de la voie Wnt a été reliée à l'inflammation induite par le fluor, et il est alors suspecté que l'activation de NFκB dans les cellules neurales serait médiée par l'inhibition de la voie Wnt.

L'ensemble de ces résultats est résumé en **figure 22**.

### c. La voie MAPK (ERK/JNK/p38)

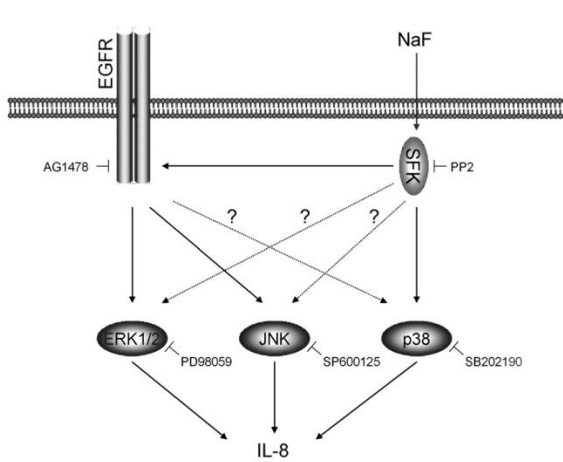
L'induction de la voie MAPK dans des modèles exposés au fluor a été mise en évidence dans différents types cellulaires, issus notamment du cerveau, des os, des muscles ou encore des poumons, et cette dernière a été mise en lien avec l'inflammation et l'apoptose (Anderson et al. 1991; Goschorska et al. 2018a; Refsnes et al. 2008; Susa et al. 1997).

L'activation de la phosphorylation de la protéine c-Jun N-terminal kinase (JNK) est induite *in vivo* dans le cerveau de rats exposés au fluor, et a été mise en corrélation avec une activité apoptotique. En effet, des expositions de 6 mois à des concentrations de 5 et 50 mg/L induisent respectivement une augmentation de la phosphorylation de JNK à hauteur de 20.5% et 107.6%, ainsi que l'apoptose des cellules cérébrales (Liu et al. 2011). Cette phosphorylation de JNK a également été mise en évidence *in vitro*, dans des cellules issues de neuroblastomes, où une corrélation a été démontrée entre le taux de cellules en apoptose et le taux de phosphorylation de la protéine. Une inhibition de l'apoptose induite par le fluor a été mise en évidence dans le cas d'un co-traitement avec un inhibiteur de JNK (Liu et al. 2011).



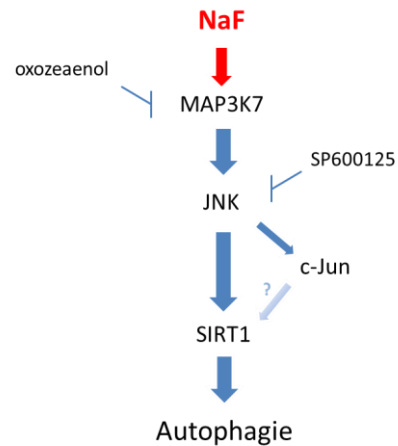
**Figure 23. Cascade d'activation des protéines MAPK impliquées dans le processus d'apoptose et de survie de cellules pulmonaires exposées au fluor**

Reproduction du modèle proposé par Thrane *et al.* 2001



**Figure 24. Mécanismes d'action impliqués dans la production d'IL-8 induite par le fluor dans des cellules pulmonaires**

Source : Refsnes *et al.* 2008



**Figure 25. Modèle d'activation des voies MAP3K, JNK et de l'autophagie dans des améloblastes murins exposés au fluor**

Adapté depuis les résultats de Suzuki *et al.* 2015

Dans des cultures primaires ainsi que dans des lignées cellulaires issues de poumons (A549), Thrane *et al.* (2001) ont mis en évidence l'induction d'apoptose, ainsi que l'activation des différentes MAPK : ERK, JNK et p38. Suite à l'utilisation de différents inhibiteurs de ERK et de p38, les auteurs proposent un modèle, présenté en **figure 23**, selon lequel la voie ERK serait capable d'inhiber l'apoptose induite par le fluor, tandis que la protéine p38 induirait l'apoptose (Thrane *et al.* 2001). D'un autre côté, l'activation de la voie des MAPK semble également responsable de la production de l'interleukine inflammatoire IL-8 dans des modèles cellulaires pulmonaires exposés au fluor (Refsnes *et al.* 2008; Refsnes *et al.* 2001). En effet, à l'aide d'inhibiteurs des différents acteurs de la voie MAPK (JNK1/2, ERK1/2 et p38), des SFKs (famille Src de tyrosines kinases non récepteurs) et du récepteur à l'EGF (epidermal growth factor), Refsnes *et al.* (2008) ont démontré l'implication partielle de toute la voie MAPK, ainsi que l'implication en amont des molécules SFKs et du récepteur à l'EGF dans la production d'IL-8, tel que décrit dans la **figure 24**.

Grâce à l'utilisation d'inhibiteurs, Suzuki *et al.* (2015) ont démontré *in vitro* qu'un traitement de 2 heures avec 5 mM de fluor pouvait induire la voie JNK dans des améloblastes murins (Suzuki *et al.* 2015). Ils ont ainsi mis en évidence, tel qu'indiqué en **figure 25**, que la phosphorylation de JNK et c-Jun passait par l'activation de la voie MAP3K, notamment par la protéine MAP3K7, et que cela induisait la phosphorylation, et par conséquent l'activation de la protéine SIRT1 impliquée dans l'induction de l'autophagie. Une autre étude a également montré la phosphorylation et l'activation de JNK et de c-Jun dans le même modèle, avec en addition l'activation de PERK et eIF2 $\alpha$ , deux protéines impliquées dans la réponse UPR face au stress du réticulum endoplasmique (RE) (Sharma *et al.* 2010).

#### d. Les voies impliquées dans la réponse au stress du RE

Une induction des protéines chaperonnes GRP94 et GRP78 (Bip) permet d'identifier un stress du RE. Une fois ce stress induit, trois voies majeures sont connues pour induire une réponse cellulaire à ce stress : PERK, ATF6, et IRE1. Des études *in vivo*, menées sur les rats, ont démontré que le fluor pouvait induire Bip, GRP94, et les trois voies d'activation de la réponse UPR dans la rate ou le tissu osseux (Deng *et al.* 2016; Liu *et al.* 2015; Sun *et al.* 2014). De plus, il a été démontré que le stress du RE pouvait induire l'apoptose, notamment à travers le clivage de la caspase 12 (Deng *et al.* 2016; Liu *et al.* 2015).

L'apoptose observée au niveau des cellules de la rate de rats exposés au fluor par gavage serait également induite par l'activation de JNK à travers la voie IRE1, après 42 jours, et dès 12 mg/kg (Deng *et al.* 2016). Une activation prolongée de la protéine CHOP, issue elle-même de l'activation de la voie eIF2 $\alpha$  par PERK, a également été démontrée et serait responsable de l'apoptose induite par le fluor (Deng *et al.* 2016; Liu *et al.* 2015; Sun *et al.* 2014).

Les résultats obtenus par Deng *et al.* (2016) *in vitro* dans des lymphocytes spléniques de souris ont également confirmé le clivage de la caspase 12, ainsi que l'activation de JNK et de CHOP par eIF2 $\alpha$ , dès l'utilisation de concentrations de 100 et 200  $\mu$ M, avec des temps de traitement respectifs de 24 et 48 heures. La phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  est aussi observable *in situ*, dans des améloblastes de souris exposées au fluor par l'eau de boisson, et cela dès la dose de 25 mg/L de NaF (Sharma *et al.* 2008). *In vitro*, dans les cellules améloblastiques LS8, il a également été mis en évidence l'induction de eIF2 $\alpha$  dès 2 heures de traitement avec 0.25 mM de NaF (Sharma *et al.* 2008; Sharma *et al.* 2010).



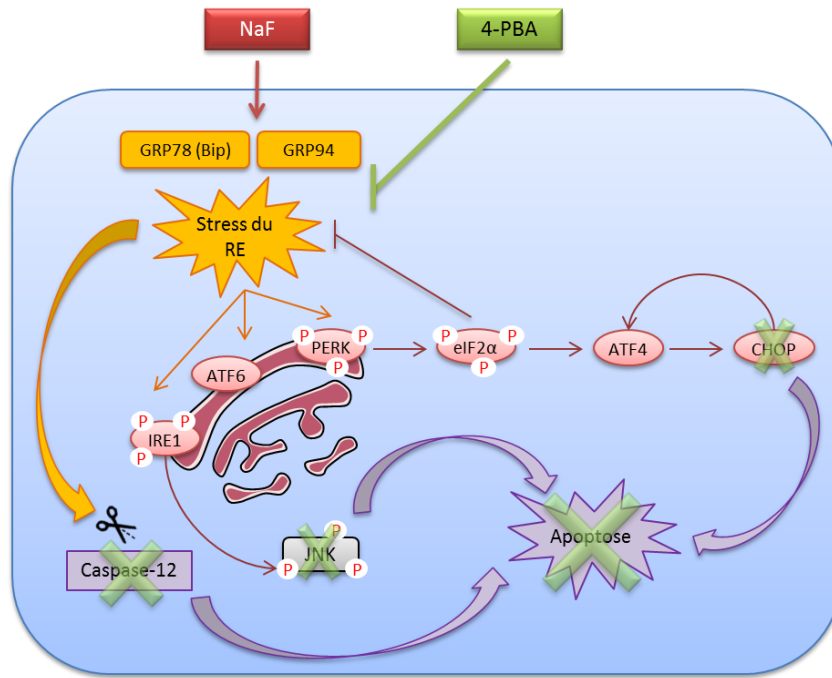


Figure 26. Modèle des voies impliquées dans le stress du RE induit par le fluor et l'interaction entre le stress du RE et l'apoptose

Schéma réalisé à partir des résultats de Deng *et al.* 2016

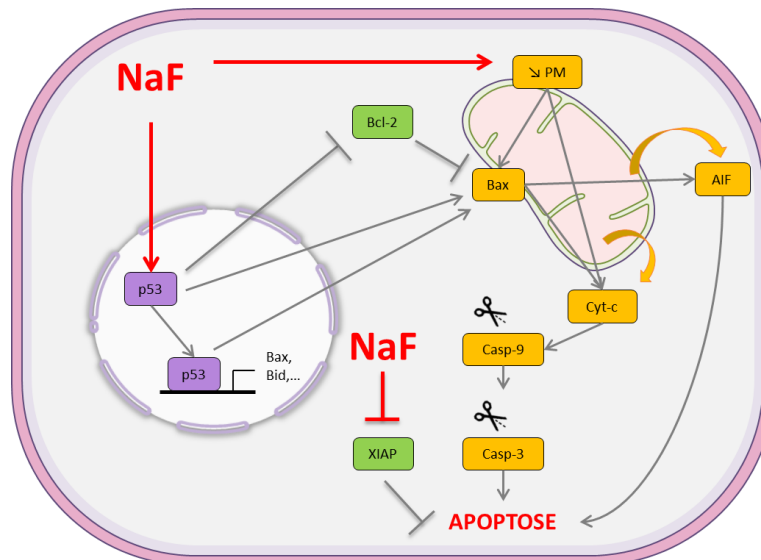


Figure 27. Modèle d'activation de la voie apoptotique mitochondriale par le fluor

De plus, l'utilisation du 4-PBA, inhibiteur du stress du RE, a permis de démontrer le lien entre l'induction du stress du RE avec l'apoptose (Deng et al. 2016), tel qu'indiqué en **figure 26**.

### e. Les molécules impliquées dans la régulation de l'apoptose

#### *α. Libération de cytochrome c*

La libération du cytochrome c (cyt c), depuis la mitochondrie dans le cytosol, est un facteur pro-apoptotique indiquant des dommages mitochondriaux, généralement induits par le stress oxydatif. L'augmentation du taux de cyt c dans le sperme de souris exposées à 150 mg/L de NaF durant 49 jours suggère l'induction d'une voie pro-apoptotique mitochondriale (Sun et al. 2011). Une autre étude *in vivo* a permis d'observer la libération de cyt c dans les améloblastes de rongeurs exposés à 50, 100 et 125 mg/L de NaF durant 6 semaines (Suzuki et al. 2015). Dans la même publication, les auteurs ont confirmé *in vitro* utilisant une lignée d'améloblastes humains traités 6 heures avec 5 mM de NaF, l'augmentation de la concentration cytosolique du cyt c en corrélation avec une diminution de sa concentration mitochondriale. Cette libération du cyt c a été associée à une augmentation des ERO dans la cellule (Suzuki et al. 2015).

#### *β. Régulation des signaux pro/anti-apoptotiques des molécules Bax et Bcl-2*

L'induction d'apoptose par le fluor a été mise en évidence au niveau de différentes structures cérébrales (Goschorska et al. 2018a). Chez des rats exposés au fluor durant 10 semaines aux doses de 60 et 120 mg/L, Yan *et al.* (2016) ont démontré l'induction d'apoptose neuronale grâce à la méthode TUNEL, ainsi qu'une augmentation de la concentration en protéine pro-apoptotique Bax, et une diminution de la concentration en protéine anti-apoptotique Bcl-2 (Yan et al. 2016). Des études menées sur des cellules embryonnaires hépatiques humaines L-02 semblent suggérer que la molécule p53 pourrait être impliquée dans la toxicité induite par le fluor dans ce même modèle (Wang et al. 2005). En effet, Wang *et al.* (2005) ont observé une augmentation de la concentration de la protéine p53 suite à une exposition au fluor, ce qui pourrait expliquer une inhibition de la molécule anti-apoptotique Bcl-2. Ces résultats ont été confirmés chez des souris traitées au NaF (12, 24 et 48 mg/kg) pendant 42 jours, avec une induction des expressions géniques et protéiques de Bax et de p53 et une diminution de l'expression génique et protéique du facteur anti-apoptotique Bcl-2 (Wei et al. 2018). Dans cette étude, une activation des caspases 9 et 3 ainsi qu'une augmentation de l'expression du facteur inducteur de l'apoptose AIF et une diminution de l'expression du facteur anti-apoptotique XIAP ont été observées.

Tous ces résultats mis bout à bout ont permis de dresser le modèle d'activation de la voie apoptotique mitochondriale présenté en **figure 27**.

### f. La voie protéine kinase C (PKC)

Les protéines PKC (protéines kinases Ca<sup>2+</sup>/calmoduline-dépendante) qui interviennent dans de nombreuses voies de signalisation cellulaires dont l'inflammation et la mort cellulaire. Il a été démontré, chez le rat, que l'inflammation hépatique induite par une exposition au fluor fait intervenir la translocation de la PKC depuis le cytoplasme jusqu'à la membrane cellulaire (Schulze-Specking et al. 1991). Cette induction et la translocation de PKC ont également été observées, de manière dose dépendante, dans des érythrocytes de rats exposés au fluor (2, 10 et 20 mg/L) durant 12 mois (Agalakova and Gusev 2013). Dans la même étude, des expérimentations *in vitro* ont montré



l'apparition de dommages membranaires avec une exposition des phospholipides et une accumulation de la concentration calcique intracellulaire dans des érythrocytes traités avec 5 mM de NaF durant 1 à 24 heures. Agalakova *et al.* ont démontré que la protéine PKC était induite dès une heure de traitement et, grâce à l'utilisation d'inhibiteurs, que cette dernière était responsable pour les effets toxiques induits par le fluor dans leur modèle (Agalakova and Gusev 2013).

L'ensemble de ces résultats a donc permis d'identifier la protéine calcium-dépendante PKC comme un acteur en partie responsable de l'inflammation et de la mort cellulaire induites par le fluor. Cependant, des études supplémentaires sont nécessaires afin de déterminer les différents isoformes de PKC impliquées dans ces processus cellulaires.

### g. Les modifications épigénétiques

Les modifications épigénétiques, dont les méthylations à l'ADN, les modifications d'histones et les ARN non codants sont impliquées dans l'extinction de gènes. Ces modifications peuvent être induites en réponse à un stress cellulaire et jouer un rôle dans la toxicité de ce dernier en régulant l'expression de gènes cibles (Cantone *et al.* 2011; Daiwile *et al.* 2018; Daiwile *et al.* 2019; Zhang *et al.* 2017a). Ainsi, l'épigénétique fournit un panel de biomarqueurs potentiels et précoces à de nombreux toxiques.

Le fluor est capable d'induire des modifications épigénétiques de gènes codant pour des protéines clés dans les mécanismes de réponses au stress, tel que *p53* (Suzuki *et al.* 2018). Les auteurs ont mis en évidence une acétylation du gène *p53* suite à un traitement de 5 mM de NaF dans des améloblastes, menant à une inhibition de la prolifération cellulaire, des dommages mitochondriaux, des dommages à l'ADN et de l'apoptose. D'autres modifications épigénétiques ont également été mises en évidence dans différents modèles, tels que les oocytes primaires de porc exposés à 5 mM de NaF dans lesquels on peut observer une méthylation à l'ADN du gène *neuronatin*, diminuant ainsi son expression et altérant le transport du glucose (Liu *et al.* 2018). Une hyperméthylation du gène *p16* est associée à une exposition au fluor, résultant dans la suppression de sa protéine associée dans une population atteinte de fluorose, ou encore dans des ostéoblastes humains en culture (Wu *et al.* 2019). De plus, le fluor induit une méthylation du promoteur de *p16*, inhibant ainsi sa transcription et son expression dans des cultures d'ostéoblastes primaires de rats (Chen and Pan 2016). La protéine p16 étant un inhibiteur des kinases dépendantes des cyclines CDK4 et CDK6, par son inhibition le fluor induit une augmentation de la prolifération des ostéoblastes avec un taux plus élevé de cellules en phase S du cycle cellulaire, et une augmentation de la viabilité (Wu *et al.* 2019). On constate alors que les modifications épigénétiques peuvent intervenir dans de nombreux processus de réponse cellulaire au fluor.

## 2. Mécanismes cellulaires impliqués dans la toxicité du fluor

### a. L'apoptose : les récepteurs de mort cellulaire et la cascade d'activation des caspases

Le phénomène de mort programmée, appelé apoptose, est induit chez différents modèles et dans plusieurs organes suite à des traitements au fluor (Goschorska *et al.* 2018a; Quadri *et al.* 2018a; Refsnes *et al.* 2003; Sun *et al.* 2011). Les mécanismes sous-jacents peuvent impliquer des récepteurs de mort, et passent par l'activation en cascade des caspases, notamment les caspases effectrices 3 et 7.



Dans des neurones primaires de rats, il a été démontré que le fluor pouvait non seulement induire l'apoptose, mais également l'arrêt du cycle cellulaire en phase S et G1 à de fortes concentrations allant de 40 à 80 mg/L (Zhang et al. 2008), participant ainsi à la décroissance neuronale de la région hippocampique observés dans de nombreux modèles exposés au fluor (Goschorska et al. 2018a). Dans les reins de souris exposées au fluor durant 42 jours (12, 24 et 48 mg/kg), une induction de la voie apoptotique mitochondriale a été démontrée, avec en aval une activation de la caspase 9 et de la caspase effectrice 3 (Wei et al. 2018). L'induction de l'apoptose par le fluor a également été mise en évidence les tissus cardiaques de rats par Quadri *et al.* (2018) grâce à la méthode TUNEL. Des expositions à 50, 100, et 150 mg/L de NaF sur une durée de 49 à 75 jours induit l'activation de la caspase 3 (Quadri et al. 2018a; Sun et al. 2011). Cette activation de la cascade apoptotique, accompagnée de la diminution de l'expression de Bcl-2 et de la caspase 3, a également été montrée *in vivo* chez le poisson zèbre (Singh et al. 2017), et *in vitro* dans des cellules de neuroblastomes, en association avec une induction de l'expression de la caspase 8, ainsi que de Fas et Fas-L (Xu et al. 2011), suggérant ainsi l'implication de la voie Fas dans l'apoptose induite par le fluor dans le cerveau.

### b. Le stress oxydatif

#### *α. Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et la peroxydation lipidique*

De nombreuses études ont mis en évidence l'induction d'ERO par le fluor de manière dose dépendante chez différents modèles (Barbier et al. 2010; Goschorska et al. 2018a; Sun et al. 2011; Zhang et al. 2007). Les ROS induits par le fluor peuvent s'attaquer directement aux membranes cellulaires et induire de la peroxydation lipidique, endommageant ainsi les membranes et altérant la fonction cellulaire. Le malondialdéhyde (MDA) est un marqueur de cette peroxydation lipidique, et est induit *in vivo* chez des rats exposés durant 28 jours à 150 mg/L de fluor (Bharti and Srivastava 2009), ainsi qu'*in vitro*, après 24 heures de traitement dans des cultures de cellules neuronales primaires dès la concentration de 20 mg/L (Zhang et al. 2007).

Durant des études *in vivo* et *in vitro*, la peroxydation lipidique a également été détectée dans des cellules sanguines (Blaszczyk et al. 2009; Shivarajashankara et al. 2003), hépatiques (Blaszczyk et al. 2009; Ghosh et al. 2008; Wang et al. 2004), rénales (Guan et al. 2000), et cardiaques (Quadri et al. 2018a).

#### *β. La régulation des enzymes impliquées dans l'équilibre redox*

Il existe tout un panel de protéines impliquées dans la régulation de la balance oxidative intracellulaire et trois enzymes endogènes majeures sont connues pour avoir un rôle antioxydant. Tandis que l'enzyme SOD (superoxyde dismutase) catalyse la formation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à partir de l'ion superoxyde, deux autres enzymes : la catalase (CAT) et la GPX (glutathion peroxydase) catalyse la formation d'eau à partir d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, permettant ainsi de diminuer la concentration d'ERO intracellulaire.

Une diminution des enzymes SOD, GPX et CAT a été mise en évidence dans les testicules et le sperme de rats exposés au fluor de manière chronique (Ghosh et al. 2002; Wang et al. 2009), ainsi que dans les tissus cardiaques (Quadri et al. 2018a). Chez le rat, lors d'un traitement aigu avec 20 mg/kg de fluor ou lors d'une exposition chronique à 150mg/L de fluor *via* l'eau de boisson, une diminution des activités de CAT, SOD et GPX, ainsi qu'une diminution du taux de GSH ont été observées dans le cerveau (Bharti and Srivastava 2009; Sarkar and Pal 2014).



*In vitro*, une diminution des protéines GPX et SOD a été constatée dans des cellules neuronales primaires, dès 20 et 80 mg/L de NaF, respectivement (Zhang et al. 2007). De plus, Zhang *et al.* ont montré une diminution du taux de GSH, un antioxydant endogène majeur. Cette diminution de GSH a également été observé dans d'autres organes, tels que le foie et le rein (Chattopadhyay et al. 2011; Wang et al. 2004), avec notamment la formation d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, une élévation des TBARS, ainsi qu'une diminution des expressions et des activités des enzymes antioxydantes SOD, GPX et CAT (Chattopadhyay et al. 2011; Chouhan and Flora 2008; Mittal and Flora 2006; Ranjan et al. 2009; Shanthakumari et al. 2004). Enfin, Suzuki *et al.* (2015) ont mis en évidence que la formation d'ERO dans des cellules d'améloblastes murins découlait de l'induction des NOX (NADPH oxydases) suite à un traitement de 3 heures avec 5 mM de fluor (Suzuki et al. 2015).

### c. Les dommages à l'ADN

Bien qu'une polémique existe encore sur la génotoxicité du fluor, de nombreuses études ont mis en évidence l'induction de dommages à l'ADN dans différents modèles (Bhowmik and Chattopadhyay 2019), incluant des aberrations chromosomiques, la formation de micronoyaux et des cassures à l'ADN.

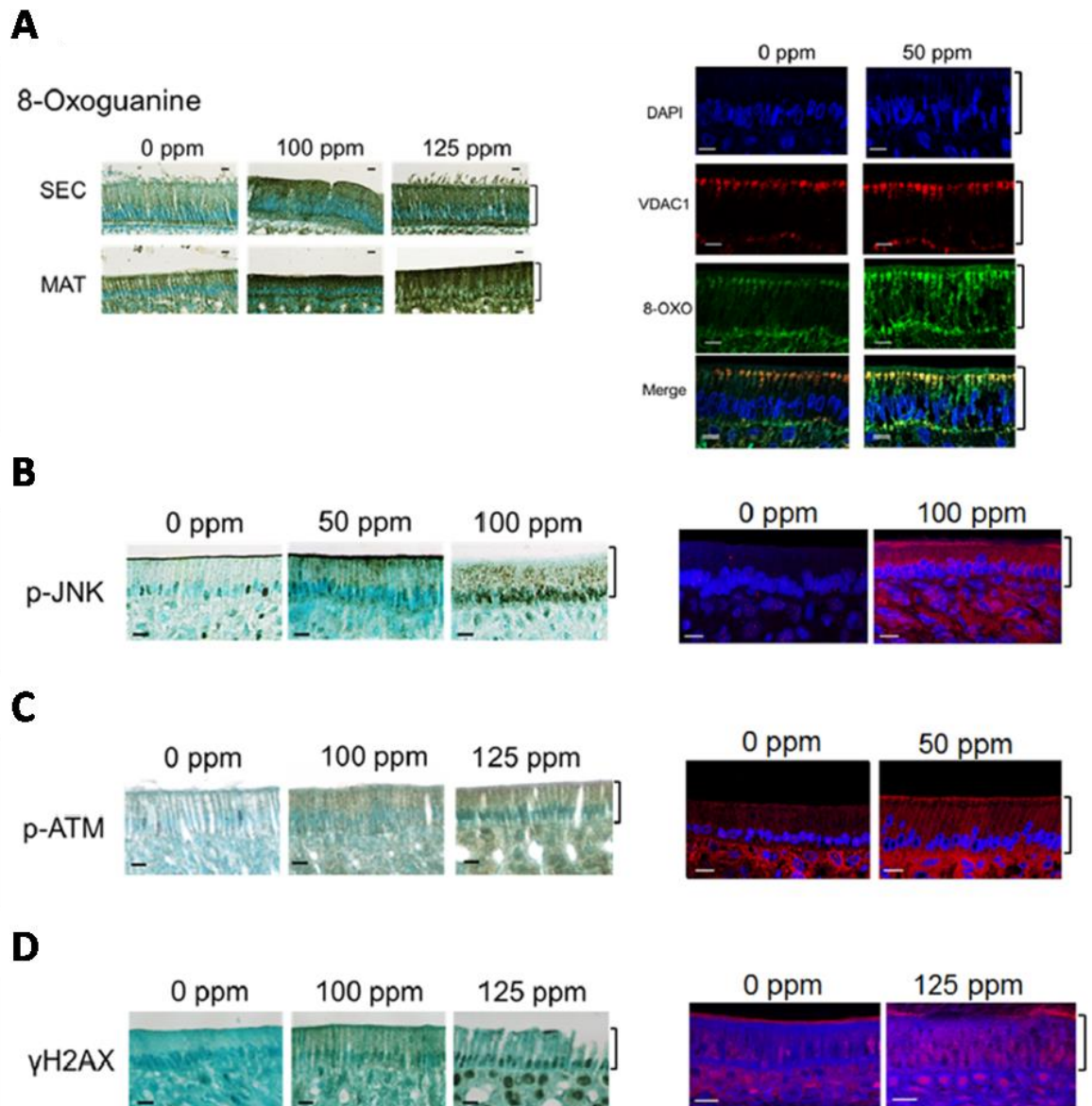
#### *α. Les aberrations chromosomiques et la formation de micronoyaux*

Une étude menée sur une population d'une région de Mongolie a démontré que la consommation d'une eau fortement concentrée en fluor (4 à 15 mg/L) induisait une augmentation de la fréquence d'apparition d'échanges de chromatides sœurs, ainsi que de la formation de micronoyaux dans les lymphocytes périphériques circulants (Wu and Wu 1995). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus ultérieurement par Joseph *et al.* (2000) qui démontrent également ces deux types de dommages à l'ADN dans les lymphocytes d'une population indienne buvant des eaux contaminées entre 1.56 et 3.46 mg/L de fluor (Joseph and Gadhia 2000), et avec les résultats obtenus précédemment montrant une augmentation du taux d'échange de chromatides sœurs dans une population buvant des eaux contaminées au fluor (1.95 à 2.2 mg/L) (Sheth et al. 1994).

Une étude *in vitro* confirme l'apparition dose-dépendante d'aberrations chromosomiques et l'induction d'échanges de chromatides sœurs à 80 µg/mL de NaF dans des cellules embryonnaires de hamster (Tsutsui et al. 1984). L'induction d'aberrations chromosomiques a également été observée dans des fibroblastes de prépuce humain traités avec 300 à 900 µg/mL de NaF (Hayashi and Tsutsui 1993), et dans des lymphocytes humains exposés à 20 et 40 µg/mL de NaF (Albanese 1987). Cependant Albanese n'a pas retrouvé cette génotoxicité *in vivo*, dans le sang de rats ayant subi des injections aiguës de fortes doses de NaF.

Malgré tout, des études chroniques ont démontré l'induction d'aberrations chromosomiques *in vivo*, avec notamment des cassures sur les chromatides (Manivannan et al. 2013; Podder et al. 2008; Tripathi et al. 2009). Podder *et al.* ont identifié le délai de 30 jours comme étant le pic d'apparition des aberrations chromosomiques dans les cellules de la moelle épinière, chez des souris exposées à 15 mg/L de fluor (Podder et al. 2008). En revanche, dans le même modèle d'exposition, il semblerait que cette génotoxicité induite par le fluor soit significativement réduite après une période de rétablissement avec une eau de boisson non contaminée (Podder et al. 2011a). La même équipe a également démontré que le taux d'aberrations chromosomiques induites par le fluor pouvait être réduit par un co-traitement avec un antioxydant augmentant le niveau de GSH intracellulaire,





**Figure 28 : Dommages à l'ADN induits par le fluor dans l'organe adamantin de rongeurs exposés au fluor**

Les animaux sont exposés durant 6 semaines *via* l'eau de boisson, à des concentrations de 0, 50, 100 et 125 mg/L de NaF. Les images sur la gauche représentent des colorations histologiques de sections d'incisives durant la phase sécrétoire (SEC) et durant la phase de maturation (MAT) du développement de l'émail. Les images sur la droite représentent des immunomarquages réalisés chez le rat (A-C) ou chez la souris (D) durant la phase de maturation. L'identification de la 8-oxoguanine dans l'organe adamantin marqué au DAPI, VDAC1 ou la 8-oxoguanine (8-OXO) montre que la 8-OXO est essentiellement localisée à l'extérieur du noyau (A). Des incisives marquées durant la phase de maturation avec du DAPI et p-JNK (B), p-ATM (C) ou  $\gamma$ -H<sub>2</sub>AX (D) montrent une induction de l'expression de ces protéines *in situ* par le fluor de manière dose-dépendante. Barre d'échelle = 10 $\mu$ m. Source : Suzuki *et al.* 2015

démontrant ainsi qu'une partie des aberrations induites serait due au stress oxydatif généré par le fluor (Podder et al. 2011b).

### *β. Les cassures à l'ADN*

Comme expliqué précédemment, il existe une controverse quant à la génotoxicité du fluor. Avec la méthode du test des comètes, qui a la capacité de révéler les cassures à l'ADN, certaines études ont constaté l'absence de ce type de dommage après une exposition au fluor.

*In vitro*, Ribeiro et al. (2004) n'ont pas mis en évidence de cassure à l'ADN dans des cellules issues de lymphomes murins et dans des fibroblastes humains après 3 heures de traitement à des concentrations de NaF allant de 7 à 100 µg/mL (Ribeiro et al. 2006), confirmant leurs résultats obtenus *in vivo* démontrant l'absence de cassure dans le sang périphérique, les muqueuses orales et les cellules cérébrales de rats exposés durant 6 semaines à des doses comprises entre 0.7 et 100 mg/L de NaF *via* l'eau de boisson (Ribeiro et al. 2004).

Cependant, d'autres études ont démontré que le fluor pouvait induire des cassures à l'ADN (Bhowmik and Chattopadhyay 2019). Des dommages ont notamment été mis en évidence par le test des comètes dans le foie de rats exposés entre 2 à 8 semaines à 100 mg/L de NaF, avec un pic des cassures arrivant à 4 semaines de traitement (Liang et al. 2018), et dans le cerveau de rats exposés à de fortes concentrations de fluor (100 mg/L) (Ge et al. 2005). De plus, une étude *in vivo* a montré l'expression *in situ* des marqueurs de dommages à l'ADN 8-oxoguanine, p-ATM et γH<sub>2</sub>AX chez des rongeurs exposés entre 50 et 125 mg/L de NaF durant 6 semaines (**figure 28**), indiquant non seulement l'induction de CDB, mais également de dommages liés au stress oxydatif (Suzuki et al. 2015).

Ces résultats ont confirmé la phosphorylation de H<sub>2</sub>AX induite par un traitement de 6 heures au NaF (0.5 à 5mM) dans une lignée d'améloblastes murins (Suzuki et al. 2015). D'autres études *in vitro* ont également mis en évidence l'induction de cassures à l'ADN, notamment dans des cellules embryonnaires hépatiques humaines et dans des ostéoblastes (Wang et al. 2004; Zhang et al. 2006). De plus, une étude menée sur des cellules primaires de rats a montré une corrélation significative entre la production d'ERO dans les neurones hippocampiques et les dommages à l'ADN observés grâce au test des comètes, indiquant que le stress oxydatif serait probablement à l'origine des cassures induites par le fluor (Zhang et al. 2008).

### **d. L'inflammation**

Comme décrit précédemment, le fluor est connu pour induire une l'inflammation chez différents modèles, et dans différents organes, notamment dans le système nerveux (Chen et al. 2017; Dec et al. 2019; Goschorska et al. 2018a; Shuhua et al. 2012; Yan et al. 2016).

### *α. La production de prostaglandines*

Dans des macrophages hépatiques de rats, il a été démontré que le fluor induisait la libération depuis la membrane cellulaire d'acide arachidonique, principal substrat de la synthèse des prostaglandines (Dieter and Fitzke 1993; Schulze-Specking et al. 1991). Une augmentation de la libération de la prostaglandine E2 (PGE2), ainsi que du thromboxane A2, deux facteurs connus comme étant pro-inflammatoires a été mise en évidence *in vitro* chez des macrophages humains THP-1 (Goschorska et



al. 2018b; Gutowska et al. 2015; Gutowska et al. 2011), et *in vivo*, dans les cerveaux de rats exposés au fluor durant leurs périodes de vie prénatale et néonatale (Dec et al. 2019). Dec *et al.* émettent l'hypothèse que la production de prostaglandine serait régulée par les cyclooxygénases COX1 et COX2 puisque ces dernières ont des expressions modulées en fonction de l'exposition au fluor (Goschorska et al. 2018b; Gutowska et al. 2015). Cette hypothèse est en accord avec les résultats obtenus par Luo *et al.* (2017) qui ont démontré que le fluor induisait une inflammation rénale, médiée par la voie NFκB, avec notamment l'induction des expressions géniques et protéiques de COX2 et de PGE2 (Luo et al. 2017).

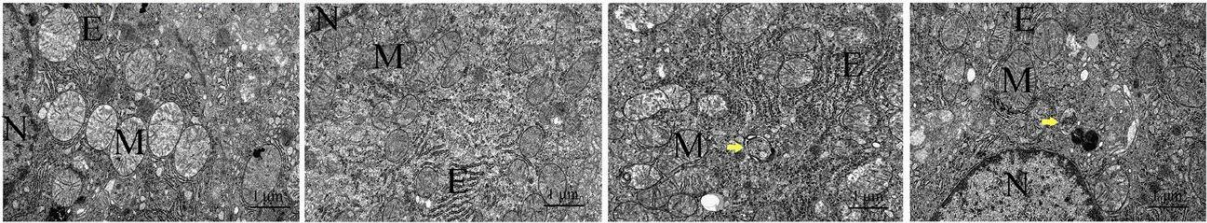
### *β. La sécrétion de cytokines pro-inflammatoires*

Il existe de nombreuses cytokines pro-inflammatoires dont la production est induite par le fluor, notamment dans le rein. En effet, la production de TNF-α, IL-1β, IL-6 et IL-8 a été observée dans le rein de souris exposées par voie intra-gastrique à 24 et 48 mg/kg de NaF durant 21 ou 42 jours (Luo et al. 2017). Le fluor induit la production de l'interleukine IL-1, d'IL-6 et du facteur TNF-α dans les hippocampes de rats exposés (Yan et al. 2016; Zhang et al. 2011), ainsi que dans les cellules microgliales (Yan et al. 2016), ce qui pourrait expliquer l'induction de la voie NFκB chez ces dernières (Chen et al. 2017). En effet, la voie NFκB est connue comme pouvant être activée par ces cytokines pro-inflammatoires, et cette voie est connue pour être induite par le fluor dans différents modèles, tel que présenté dans la partie précédente. De plus, Quadri *et al.* (2018) ont démontré qu'une exposition à 50 ou 100 mg/L de fluor dans l'eau de boisson pouvait induire la sécrétion d'IL-17, une cytokine pro-inflammatoire, dans les tissus cardiaques de rats (Quadri et al. 2018a). La production de la cytokine IL-17 a également été observée dans le foie de souris exposées à 50 et 100 mg/L de NaF durant 150 jours (Zhao et al. 2018). *In vitro*, dans des cellules pulmonaires humaines A549, Refsnes *et al.* ont démontré que le fluor pouvait induire la libération d'IL-6 et d'IL-8, cette dernière étant connue pour jouer un rôle crucial dans le recrutement des neutrophiles sur le site inflammatoire (Refsnes et al. 1999; Refsnes et al. 2008). Il semblerait que l'induction de la production d'IL-8 dans ce modèle serait due à l'activation des protéines MAPK ERK1/2, JNK1/2 et p38, comme expliqué précédemment (Refsnes et al. 2008; Refsnes et al. 2001).

### *e. L'autophagie*

L'autophagie est un mécanisme cellulaire de réponse au stress qui consiste à dégrader et à recycler les organites et les macromolécules afin de maintenir l'homéostasie intracellulaire. Ce dernier est en interaction avec de nombreux autres mécanismes de réponse au stress, notamment avec l'apoptose, le stress oxydatif et la réponse UPR. Il a été démontré qu'une activité basale de l'autophagie jouait un rôle essentiel à la survie des cellules des TCP en conditions normales, mais également que l'induction de l'autophagie avait un rôle cytoprotecteur dans le rein en cas d'exposition à un toxique (Kaushal and Shah 2016; Liu et al. 2014). Des études ont démontré une modulation de l'autophagie par le fluor, mais toutes ne retrouvent pas des résultats similaires, selon le modèle, la dose d'exposition et l'organe étudié.

Des observations ont été faites au MET sur des cellules humaines de neuroblastomes traitées 24 heures avec du fluor, constatant une diminution du nombre d'autophagosomes (identifiés grâce à un marquage à l'acridine orange) après des traitements avec 40 et 60mg de fluor. De plus, une diminution des protéines Atg5 et LC3B et une augmentation du taux de p62 ont été constaté *in vitro*



**Figure 29 : Dommages ultrastructuraux et formation d'autophagosomes dans le tissu hépatique de souris exposées au fluor**

Les souris reçoivent une eau de boisson contaminées avec 150 mg/L de NaF durant 150 jours. Les images sont obtenues par microscopie électronique à transmission. Les flèches jaunes indiquent la présence d'autophagosomes. Source : Zhao *et al.* 2018

dans des neuroblastes SH-SY5Y traités au fluor, confirmant ainsi une diminution de l'activité autophagique (Tang et al. 2017).

Cependant, d'autres études semblent indiquer une régulation positive de l'autophagie dans des modèles exposés au fluor. La protéine SIRT1 (silent mating type information regulation), qui est connue pour induire des systèmes de régulation cellulaire dont l'autophagie, est induite *in vitro* par un traitement de 6 heures au fluor (5 mM) dans des améloblastes humains (Suzuki and Bartlett 2014). Cette activation de SIRT1 se fait non seulement au niveau de sa transcription, mais également par sa phosphorylation. Dans le même modèle d'exposition, son induction semble passer par l'activation de JNK, elle-même induite par la voie des MAPK (Suzuki et al. 2015). L'induction de cette protéine SIRT1 a été mise en corrélation avec une augmentation des gènes et des protéines Atg5, Atg7 et LC3B, indicateurs d'une activation du mécanisme d'autophagie, dans le même modèle *in vitro*. Des résultats similaires ont été trouvés *in vivo* chez des rats exposés à 50, 100 et 125 mg/L de fluor durant 6 semaines (Suzuki and Bartlett 2014). La formation d'autophagosomes a été observée par MET (**figure 29**) dans les foies de souris exposées à 50 et 100 mg/L de fluor sur une période de 150 jours, avec notamment une induction des expressions géniques et protéiques de LC3B et Beclin-1 (Zhao et al. 2018), indiquant que l'activation de l'autophagie ferait partie des mécanismes mis en place au niveau cellulaire afin de lutter contre la toxicité induite par le fluor.

### f. Le stress du RE et la réponse UPR

Les protéines chaperonnes GRP94 et GRP78 (Bip) sont des marqueurs du stress du RE, tandis que trois voies majeures PERK, ATF6, et IRE1 sont connues pour induire une réponse à ce stress : la réponse UPR. Des études *in vivo* menées sur les rats, ont démontré que le fluor pouvait induire Bip, GRP94, et les trois voies d'activation de la réponse UPR dans la rate ou le tissu osseux (Deng et al. 2016; Liu et al. 2015; Sun et al. 2014). Dans les ostéoblastes de rat, cette induction se constate 1 à 3 mois après un traitement par gavage, dès la dose de 10 mg/kg/jour (Sun et al. 2014), mais également après 8 semaines d'exposition à des eaux de boissons contenant 50, 100 et 150 mg/L de fluor, avec une induction dose dépendante du stress du RE (Liu et al. 2015).

L'induction du stress du RE a été mise en lien avec l'activité apoptotique induite par le fluor, notamment à travers les voies JNK et CHOP, mais aussi par l'activation dose dépendante de la caspase 12 après 8 semaines de traitement (50 à 150 mg/L) (Deng et al. 2016; Liu et al. 2015). Deng *et al.* (2016) ont aussi observé son activation dans la rate après 42 jours de traitement (12 à 48 mg/kg), en accord avec l'observation d'une induction d'apoptose chez les splénocytes.

L'activation de la voie eIF2 $\alpha$  a également été décrite *in vivo* dans la rate de souris traitées avec 48 mg/kg pendant 21 jours, et *in vitro* dans des lymphocytes spléniques murins traités avec 100 ou 200  $\mu$ M de fluor durant 24 à 48 heures. Or, cette voie est connue pour induire une diminution de la synthèse protéique, permettant ainsi à la cellule de diminuer l'accumulation de protéines mal conformées dans le réticulum, et de réduire le stress du RE.

Les résultats obtenus *in vitro* dans des ostéoblastes et des lymphocytes spléniques de souris ont permis de confirmer l'induction du stress du RE et de la réponse UPR (Deng et al. 2016; Sun et al. 2014). Deng *et al.* (2016) ont également confirmé l'induction de l'apoptose avec le clivage de la caspase 12, ainsi que l'activation de JNK et de CHOP dans des lymphocytes spléniques, dès 100 et 200  $\mu$ M, avec des temps de traitement respectifs de 24 et 48 heures. De plus, leur utilisation du



4-PBA, inhibiteur du stress du RE, a permis de démontrer le lien entre l'induction du stress du RE avec l'apoptose, tel que dans le modèle proposé précédemment en **figure 26**.

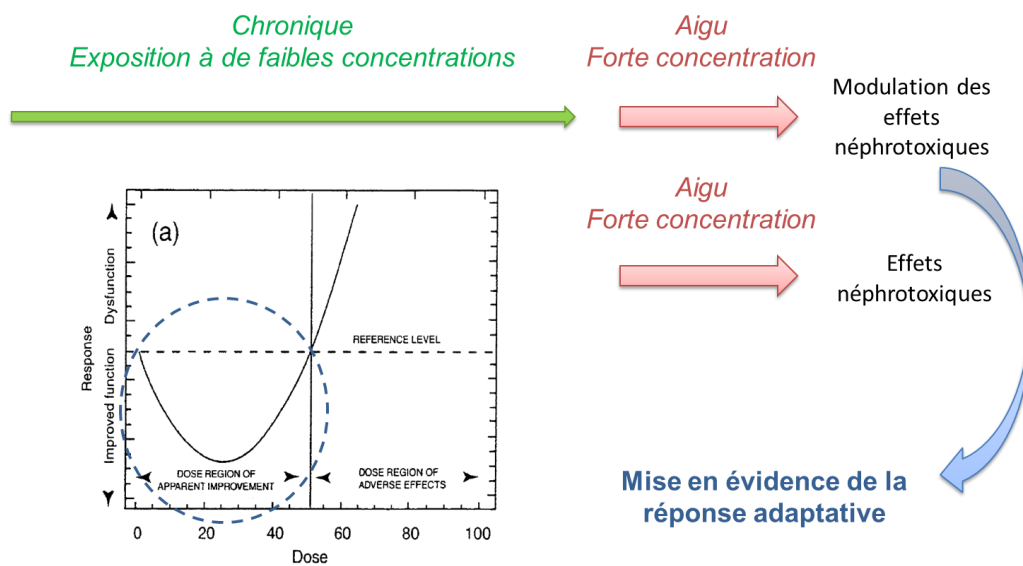




---

**PROBLÉMATIQUE**

---



Calabrese et Baldwin, 2003 *Annu Rev Pharmacol Toxicol*

**Figure 30 : Méthodologie pour la mise en évidence d'une réponse adaptative en comparant des animaux ayant reçu une dose prime et une dose challenge avec des animaux ayant reçu seulement une dose challenge**

L'étude des effets toxicologiques aux faibles doses d'agents ionisants ou d'agents chimiques est un défi visant à déceler des effets fins et nécessitant des marqueurs physiopathologiques très sensibles et spécifiques, des effectifs suffisamment importants et des protocoles expérimentaux spécifiques.

À faibles doses, de nombreuses études expérimentales ont mis en évidence l'existence d'une réponse adaptative, avec une diminution des effets délétères en comparaison à ce qu'il serait attendu en réponse linéaire (Guéguen et al., 2019). C'est notamment le cas pour l'uranium et le fluor, deux substances d'origine naturelle et anthropogénique auxquelles l'Homme peut être exposé à faible dose. Bien que ces deux agents soient connus comme étant néphrotoxiques lors d'une exposition aiguë, les travaux précédemment réalisés au laboratoire ont démontré que l'uranium n'induisait pas d'effets néphrotoxiques lors d'une exposition chronique (Poisson et al. 2014), malgré des concentrations cumulées à l'organe connues comme étant néphrotoxiques lors d'un traitement aigu. De manière similaire, il a été montré au CINVESTAV qu'une pré-contamination chronique à de faibles doses de fluor réduisait les effets néphrotoxiques induits par un second traitement à la gentamicine, mettant ainsi en évidence une réponse adaptative (Cardenas-Gonzalez et al. 2016). L'ensemble de ces résultats, ainsi que ceux de la littérature connus jusqu'à présent, ont alors soulevé des questionnements quant aux effets chroniques à faibles doses d'uranium et de fluor dans le rein.

**L'objectif de cette thèse est de mettre en évidence expérimentalement cette réponse adaptative et d'en identifier les mécanismes cellulaires et moléculaires.**

Pour ce faire, l'exposition chronique de souris C57BL/6J à de faibles doses prime d'uranium ou de fluor est réalisée afin d'observer si cela confère un effet protecteur ou non vis-à-vis d'une dose challenge plus fortement concentrée. Des animaux ayant reçu une exposition prime à l'uranium ou au fluor avant de recevoir une dose challenge sont alors comparés avec des animaux qui n'ont reçu que la dose challenge. Cette comparaison permet de voir si l'exposition chronique à de faibles doses prime confère un effet protecteur ou non vis-à-vis de la dose challenge plus fortement concentrée (**figure 30**).

Les études menées dans le premier axe de thèse ont permis de déterminer les conditions challenge à l'aide d'analyses biochimiques urinaires et rénales, immuno-histologiques et moléculaires. Le but de cette première étude dose-réponse aiguë est de s'assurer que le moyen d'administration, le délai, et la dose d'uranium et de fluor induisent bien des effets néphrotoxiques, suffisamment forts pour être détectables avec nos biomarqueurs, mais sans que cela n'empêche de déceler une réponse adaptative. L'expertise du laboratoire dans le domaine de la néphrotoxicité de l'uranium, ainsi que la bibliographie ont permis de définir certaines conditions d'exposition : injection IP et étude de la néphrotoxicité 48 et 72 heures post-injection conformément aux études précédentes qui montrent un pic de néphrotoxicité à ces temps (Sangeetha Vijayan et al. 2019; Sangeetha Vijayan et al. 2016; Zimmerman et al. 2007). Les doses testées, 2, 4, et 5 mg/kg ont été choisies car elles induisent des effets néphrotoxiques modérés (Gueguen and Rouas 2012; Sangeetha Vijayan et al. 2019; Sangeetha Vijayan et al. 2016; Taulan et al. 2006). En revanche, la néphrotoxicité aiguë du fluor est moins bien décrite dans la littérature. Les doses de 2, 5 et 10 mg/kg ont été sélectionnées à partir de la littérature (Dote et al. 2000b; Santoyo-Sanchez et al. 2013), et de l'expertise que détient le CINVESTAV quant à la néphrotoxicité du fluor chez la souris.

Après sélection du délai et de la dose challenge, le protocole de mise en évidence de la réponse adaptative est réalisé. Des souris ont été contaminées durant 6 mois à des doses prime non délétères



(0, 10, 20 et 40 mg/L d'uranium et 0, 15, 30 et 50 mg/L de fluor), sélectionnées à partir d'études précédentes (Cardenas-Gonzalez et al. 2016; Chattopadhyay et al. 2011; Dublineau et al. 2014; Grison et al. 2016; Gueguen et al. 2014; Poisson et al. 2014). Les animaux sont ensuite traités aux concentrations challenge, et euthanasiés afin de pouvoir identifier le seuil d'apparition de la réponse adaptative rénale et les mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents.

Les différents mécanismes étudiés ont été choisis car ils sont connus pour être impliqués dans la néphrotoxicité de l'uranium ou du fluor chez des modèles *in vitro et in vivo*, tels que le stress oxydatif, les dommages à l'ADN, ou l'apoptose (Hao et al. 2014; Lee et al. 2008; Thiebault et al. 2007; Xu et al. 2011) ou plus généralement impliqués dans la réponse adaptative à des agents radiotoxiques et chimiques tel que l'autophagie et la réponse UPR (Gueguen et al. 2019; Kroemer et al. 2010; Pierrefite-Carle et al. 2016; Schroder 2006; Szumiel 2012).

La caractérisation d'une réponse adaptative à une exposition de faibles doses d'uranium et de fluor et l'identification des mécanismes biologiques impliqués devrait à terme permettre d'améliorer l'évaluation des risques sanitaires d'exposition chronique lors d'une contamination interne à faibles doses.



---

**MATÉRIEL ET MÉTHODES**

---



Poids moléculaires (g/mol)			
Nitrate d'uranyle	Uranium	Fluorure de sodium	Fluor
502.13	238.03	41.99	19.00

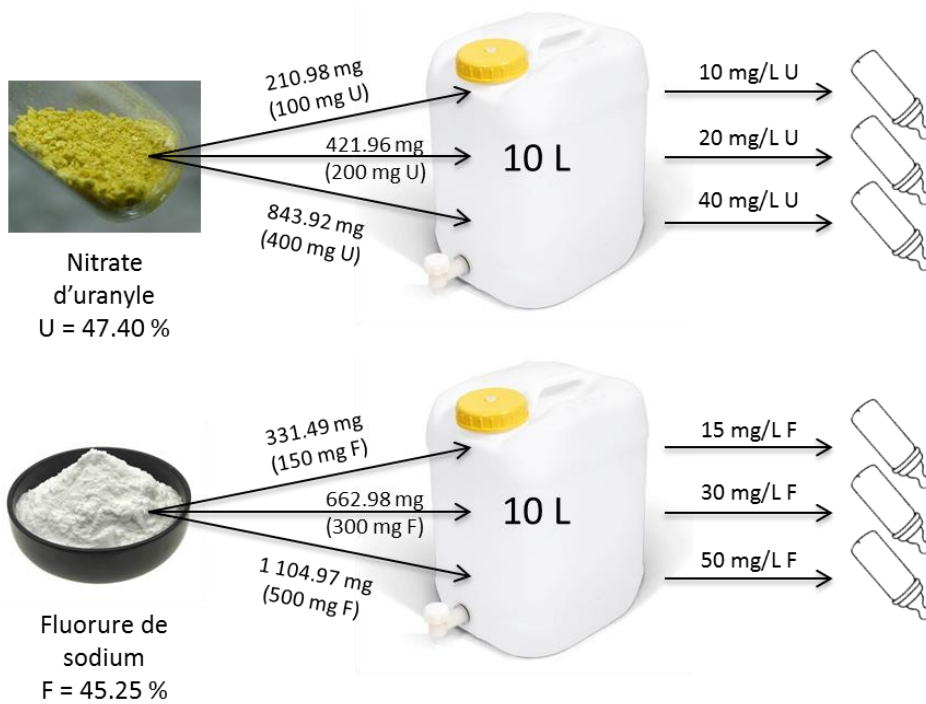


Figure 31. Préparation des eaux de boissons contaminées à l'uranium et au fluor

## I. Matériel des études *in vivo*

### A. Modèle animal

#### 1. Autorisation du projet expérimental

Les études expérimentales sur animaux sont menées dans l'animalerie interne de l'IRSN, accréditée par le Ministère de l'Agriculture Français pour réaliser des expérimentations sur les rongeurs. Les expérimentations sont réalisées conformément à la législation française et européenne d'utilisation des animaux à des fins scientifiques (Directive EC 2010/63/EU et décret Français 2013–118). Toutes les expériences ont été approuvées par le comité d'éthique de l'IRSN #81, et autorisées le 4 Juillet 2017 par le Ministère Français de la Recherche sous la référence APAFIS#9324-2017031613376362 v1 (projet interne n° P16-05).

#### 2. Modèle souris C57BL/6J et hébergement à l'animalerie

Le modèle rongeur utilisé durant toute la thèse est la souris C57BL/6J mâle, âgé de 8 à 10 semaines au début des expérimentations. Les animaux proviennent de la société Charles River (France) et sont acclimatés à l'animalerie de l'IRSN avant toute expérimentation. Cette acclimatation dure une semaine dans le cas des expérimentations de toxicité aiguë qui ne durent que peu de temps, et trois semaines dans le cas des expérimentations de toxicité chronique car ces dernières durent six mois.

Les souris sont hébergées dans des cages avec un libre accès à l'eau de boisson et à la nourriture, réparties à six par cage durant les expérimentations aiguës (durée de 3 semaines), et trois par cage durant les expérimentations chroniques (durée de 6 mois). Les animaux sont soumis à un cycle lumière/obscurité de 12h/12h dans des pièces d'hébergement maintenues à  $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . L'environnement des animaux est enrichi avec la présence de maisonnettes, ainsi que de papier kraft ou de cotons dans les cages. Les animaux sont également suivis de manière hebdomadaire durant toutes les expérimentations : poids, aspect général, comportement et consommation hydrique.

### B. Préparation des solutions

#### 1. Solutions anesthésiques

Les animaux ont été anesthésiés avec une injection intrapéritonéale (IP) de 100 mg/kg de kétamine (Imalgène 1000, Centravet, Dinan, France) et 10 mg/kg de xylazine (5% Rompun, Centravet, Dinan, France) diluées dans du NaCl 9 %.

#### 2. Nitrate d'uranyle

##### a. Préparation des solutions de boissons

Les souris contaminées ont été exposées à une solution d'UA obtenue par dissolution de cristaux de nitrate d'uranyle hexahydraté de formule chimique :  $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (ORANO/Cogema, France). La composition isotopique de l'UA est la suivante :  $^{238}\text{U} = 99.74\%$ ,  $^{235}\text{U} = 0.26\%$ , and  $^{234}\text{U} = 0.001\%$ .

Les cristaux sont dissous dans des bidons avec de l'eau Volvic® afin d'obtenir des boissons aux concentrations souhaitées : 10, 20 ou 40 mg/L d'uranium, soit 21.1, 42.2 ou 84.4 mg/L de nitrate d'uranyle, tel que montré dans la **figure 31**. Ces concentrations correspondent respectivement à des



expositions de 1.4, 2.8 et 5.6 mg/kg/jour d'uranium chez nos souris. Les biberons des animaux sont alors lavés et remplis avec les solutions préparées, puis changés une fois par mois.

### b. Préparation des solutions d'injections

Avant d'effectuer les injections intrapéritonéales d'uranium aux souris, une masse de nitrate d'uranyle est pesée le jour même des injections pour faire une solution mère dans du NaCl 9%. Après une longue agitation pour assurer une bonne dissolution du sel, cette solution mère est filtrée et stérilisée avec des pores de 0.2  $\mu\text{m}$ , avant d'être diluée afin d'obtenir des solutions filles aux concentrations suivantes : 0.2, 0.4, et 0.5 mg/mL de nitrate d'uranyle. En injectant aux souris un volume de 10  $\mu\text{L/g}$  de poids corporel de ces solutions, nous obtenons alors nos doses de traitements aigus respectifs de 2, 4, et 5 mg de nitrate d'uranyle/kg de poids corporel.

## 3. Fluorure de sodium

### a. Préparation des solutions de boissons

Les souris contaminées ont été exposées à une solution de fluorure de sodium (NaF) obtenue par dissolution de poudre de NaF (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) dans de l'eau Volvic® afin d'obtenir des boissons aux concentrations souhaitées : 15, 30 ou 50 mg/L de fluor, soit 33.15, 66.3, ou 110.5 mg/L de NaF, tel que montré dans la **figure 31**. Ces concentrations correspondent respectivement à des expositions de 2.1, 4.2 et 7.0 mg/kg/jour de fluor chez nos souris. Les biberons des animaux sont alors lavés et remplis avec les solutions préparées, puis changés une fois par mois.

### b. Préparation des solutions d'injections

Avant d'effectuer les injections intrapéritonéales de fluor aux souris, une masse de fluor, sous forme de NaF, est pesée le jour même des injections pour faire une solution mère dans du NaCl 9 %. Cette solution mère est ensuite filtrée et stérilisée avec des pores de 0.2  $\mu\text{m}$ , avant d'être diluée afin d'obtenir des solutions filles aux concentrations suivantes : 0.25, 0.50, 0.75, et 1.00 mg de F/mL. En injectant aux souris un volume de 10  $\mu\text{L/g}$  de poids corporel de ces solutions, nous obtenons alors nos doses de traitements aigus respectifs de 2, 5, 7.5, et 10 mg de F/kg de poids corporel.

## 4. Choix de l'eau de boisson

Les premiers essais de préparation d'eaux contaminées à l'uranium et au fluor dans l'eau de boisson sont effectués dans de l'eau Evian®. En effet, cette eau avait été utilisée pour les contaminations internes par les radionucléides dont l'uranium lors de toutes les études précédentes menées à l'IRSN depuis 2001 en raison de la stabilité de sa composition minérale. Les préparations permettaient une bonne dissolution du nitrate d'uranyle, sans formation de précipités même à des concentrations pouvant atteindre 600 mg/L (Frelon et al. 2005; Paquet et al. 2003; Poisson et al. 2014). Cependant, nous avons remarqué que des précipités de fluor se formaient aux concentrations de 30 et 50 mg/L, probablement dus à la présence de nombreux minéraux dans l'eau d'Evian, en particulier le calcium, et de la forte réactivité des ions fluorures avec ceux-ci. Grâce à l'expertise de l'équipe d'O. Barbier (Cinvestav, Mexique) qui avait précédemment effectué ce type d'exposition, nous avons testé la dissolution du fluor et de l'uranium dans différentes eaux de boissons dont la teneur en minéraux est plus faible (Volvic, Mont-Roucoux, et de l'eau filtrée dédiée aux animaux), puis attendu 48 heures afin de s'assurer qu'aucun précipité ne s'était formé. Les résultats ont montré que l'eau Volvic ainsi

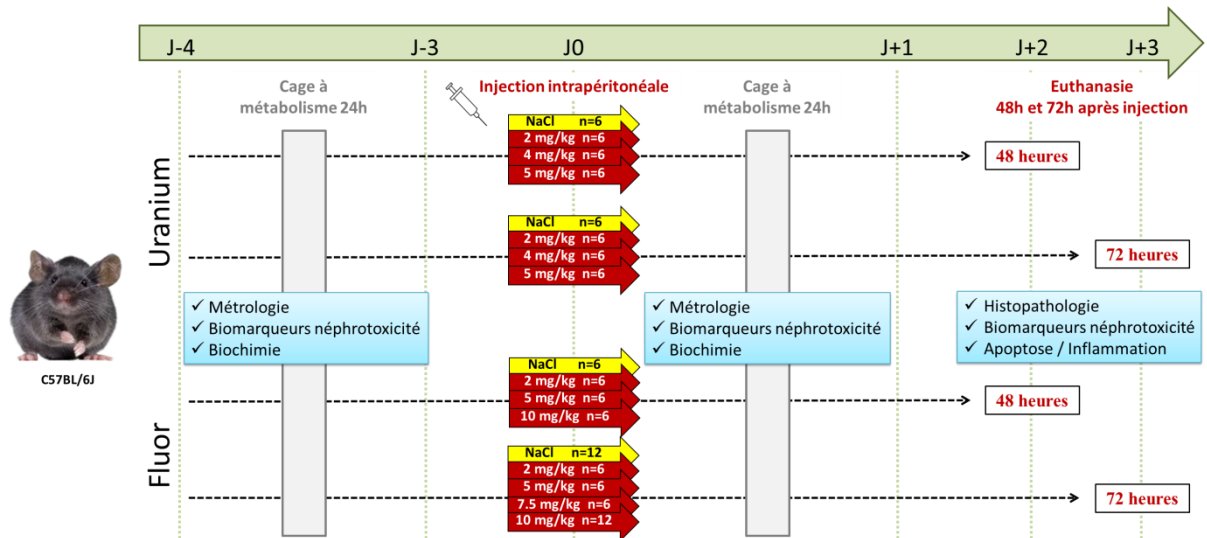


Figure 32 : Protocole expérimental de traitement aigu (challenge) d'uranium ou de fluor par injection IP chez la souris C57BL/6J

que l'eau Mont-Roucoux ne présentait pas de précipités de fluor ou d'uranium. Notre choix s'est donc porté sur la Volvic pour les expérimentations de contamination interne.

## II. Méthodes des études *in vivo*

### A. Protocoles expérimentaux

Lors des protocoles expérimentaux, les souris sont réparties de façon aléatoire entre les lots témoins et les lots contaminés. Le protocole de contamination à l'uranium et au fluor s'est déroulé en deux phases : une phase d'exposition aiguë permettant de définir les conditions challenge (dose et délai avant euthanasie), et la seconde phase d'exposition chronique suivie d'une injection aiguë, correspondant à l'exposition prime suivie de la dose challenge pour évaluer la réponse adaptative.

#### 1. Protocole d'exposition aiguë (challenge)

Le protocole réalisé est un protocole dose-réponse, où les animaux reçoivent des concentrations de nitrate d'uranyl de 0, 2, 4, et 5 mg/kg, et des concentrations de fluor de 0, 2, 5, 7.5, et 10 mg/kg, sous la forme de fluorure de sodium. Les animaux ont été répartis en quatre lots, comme montré en **figure 32** :

- le premier lot a été euthanasié 48 heures après injection IP des différentes doses d'uranium (n=6)
- le second lot a été euthanasié 72 heures après injection IP des différentes doses d'uranium (n=6)
- le troisième lot a été euthanasié 48 heures après injection IP des différentes doses de fluor (excepté 7.5 mg/kg) (n=6)
- le quatrième lot a été euthanasié 72 heures après injection IP des différentes doses de fluor (n=6 à 12)

Le protocole d'exposition aiguë au fluor s'est fait en deux temps :

- Une première expérimentation avec des doses de 0, 2, 5 et 10 mg/kg de NaF a été réalisée avec les deux temps d'euthanasie post injection IP (48 et 72 heures)
- Une seconde expérimentation avec 0, 7.5 et 10 mg/kg de NaF a été réalisée avec une euthanasie 72 heures après traitement IP

La réalisation en deux temps de ce protocole découle des résultats obtenus lors de la première phase et explique la différence de nombre d'animaux par lot, et l'absence de groupe traité à 7.5 mg/kg et euthanasié 48 heures après injection.

Afin de réaliser la métrologie de l'uranium et du fluor dans les urines, et de mesurer des paramètres de fonctionnalité rénale, les animaux sont mis individuellement en cage à métabolisme (Tecniplast, Decines Charpieu, France) durant 24 heures, 4 jours avant l'injection IP, puis sont replacés en cage à métabolisme immédiatement après l'injection.

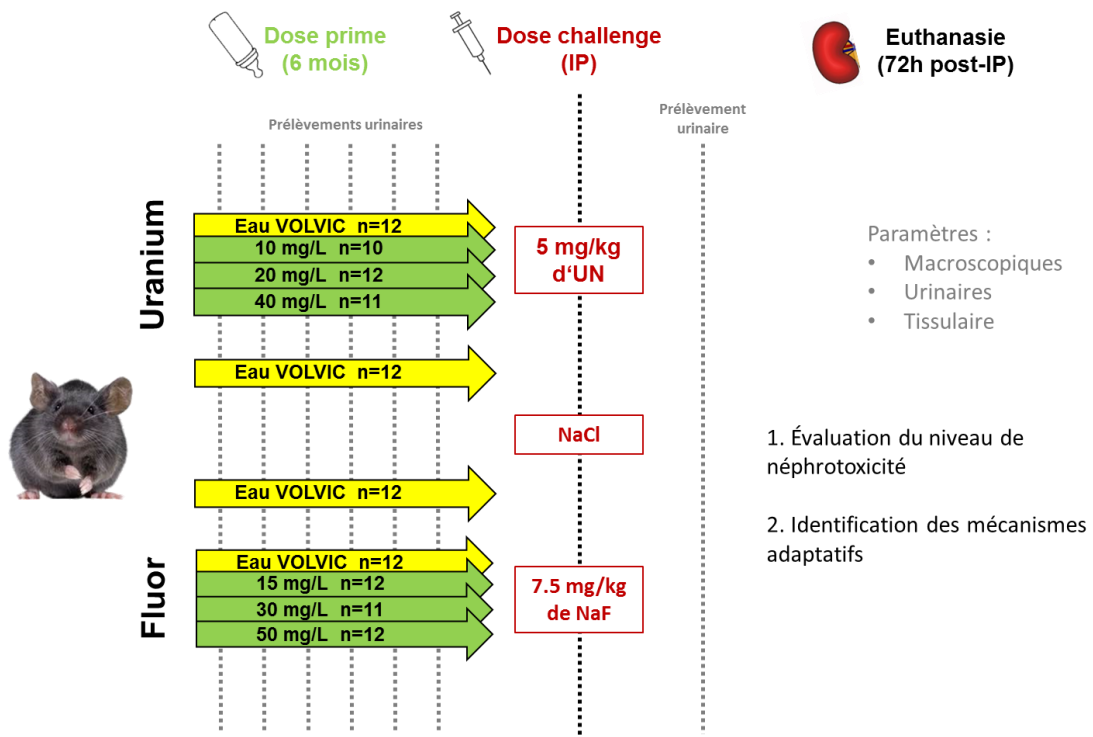


Figure 33 : Protocole expérimental de contamination chronique (prime), suivie d'un traitement aigu (challenge) par injection IP d'uranium ou de fluor chez la souris C57BL/6J

### *2. Protocole de contamination chronique (prime) suivi d'une exposition aiguë (challenge)*

L'objectif du protocole expérimental est de mettre en évidence expérimentalement une réponse adaptative dans le rein suite à une exposition chronique à de faibles concentrations d'uranium ou de fluor. Pour cela, des souris recevant uniquement la dose challenge légèrement néphrotoxique sélectionnée lors du protocole précédent (5 mg/kg pour l'uranium et 7.5 mg/kg pour le fluor), sont comparés à des souris recevant la même dose challenge, mais précédée d'une exposition chronique de 6 mois à faible dose, correspondant à la dose prime du protocole, tel que décrit précédemment dans la **figure 30**. Le but de ce nouveau protocole est de voir si l'exposition chronique précédant l'injection de la dose challenge confère un effet protecteur ou non vis-à-vis de la dose challenge seule.

Le protocole réalisé est un protocole dose-réponse d'exposition chronique. Les animaux boivent une eau contaminée par l'uranium ou le fluor (0, 10, 20, et 40 mg/L d'uranium, sous forme de nitrate d'uranyle ou 0, 15, 30, et 50 mg/L de fluor, sous forme de fluorure de sodium) pendant 6 mois. Durant ce temps de contamination chronique les animaux sont suivis grâce à des pesées hebdomadaires, à un suivi de leur consommation hydrique, ainsi qu'à leur comportement. De plus, des prélèvements urinaires mensuels sont effectués pour évaluer la quantité d'urine, la métrologie de l'uranium et du fluor, ainsi que des paramètres de fonctionnalité rénale. Après les 6 mois de contamination chronique, les animaux reçoivent une injection intrapéritonéale de NaCl, d'uranium (5 mg/kg) ou de fluor (7.5 mg/kg), puis sont euthanasiés 72 heures après.

Les animaux ont été répartis en deux lots, comme montré en **figure 33** :

- le premier lot contient deux groupes de souris non contaminées par l'eau de boisson puis traitées, soit avec du NaCl 9% (témoin négatif), ou 5 mg/kg d'uranium (témoin positif), et des groupes de souris contaminées à l'uranium par l'eau de boisson pendant 6 mois puis injecté avec 5 mg/kg d'uranium.
- le second lot contenant deux groupes de souris non contaminées par l'eau de boisson puis traitées, soit avec du NaCl 9% (témoin négatif), ou 7.5 mg/kg de fluor (témoin positif), et des groupes de souris contaminées au fluor par l'eau de boisson pendant 6 mois puis injecté avec 7.5 mg/kg d'uranium.

### **B. Techniques d'analyses biologiques**

#### **1. Prélèvement du matériel biologique**

##### **a. Prélèvement des urines**

Lors des deux protocoles expérimentaux précédemment décrits les animaux sont placés individuellement en cage à métabolisme durant 24 heures afin de récupérer les urines. Celles-ci sont ensuite placées dans des tubes, centrifugées à 3 000 g pendant 2 minutes à 4°C, aliquotées, puis conservées à -80°C.



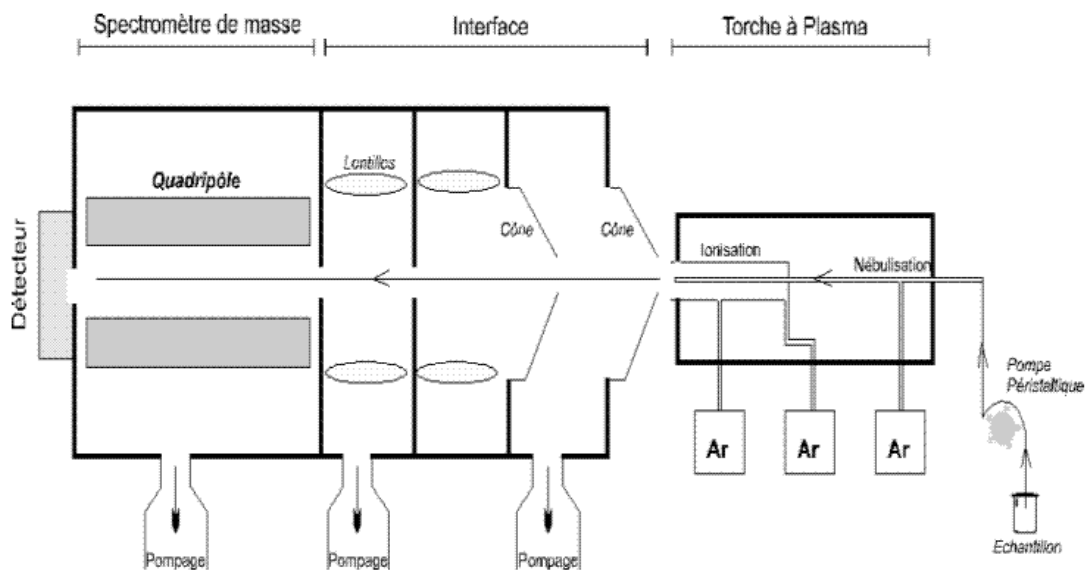


Figure 34: Schéma du principe de l'ICP-MS

### b. Prélèvement du sang

Une fois les animaux anesthésiés par injection IP avec le mélange de kétamine/xylazine, le sang a été prélevé par ponction intracardiaque, avec une seringue préalablement héparinée. Le sang est déposé dans un tube maintenu sur glace, puis centrifugé 10 minutes à 4 000 g, à 4°C. Le plasma est récupéré, aliquoté, puis stocké à -80°C.

### c. Prélèvement des reins

Les deux reins des souris ont été prélevés, puis pesés, avant d'être coupés en deux suivant une coupe sagittale, afin d'obtenir deux moitiés de structure équivalente. Une moitié du rein droit a été mise dans le formaldéhyde 4 %, pour les analyses histologiques, tandis que l'autre moitié du rein droit est pesée puis stockée à -20°C pour réaliser la métrologie de l'uranium ou du fluor. Le rein gauche a été prélevé pour faire les analyses de biologie moléculaire après avoir été placé dans l'azote liquide immédiatement après son prélèvement, puis stocké à -80°C.

## 2. Techniques de métrologie de l'uranium et du fluor

### a. Dosage de l'uranium par ICP-MS

#### *α. Principe de l'ICP-MS*

La quantité d'uranium accumulée est mesurée au niveau tissulaire et urinaire grâce à la spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS : inductively coupled plasma mass spectrometry, ICPMS-VGPQ, Excell, ThermoElectron, Villebon-sur-Yvette, France). Cette technique est basée sur le couplage d'une torche à plasma générant des ions et d'un spectrophotomètre de masse quadripolaire pour séparer ces ions en masse (**figure 34**).

La méthode consiste à ioniser l'échantillon en l'injectant dans un plasma d'argon. Le plasma est un gaz ionisé électriquement neutre :  $\text{Ar} \leftrightarrow \text{Ar}^+ + \text{e}^-$ .

L'argon est utilisé car sa capacité à ioniser est importante (PI= 15,76 eV). La température du plasma varie environ de 6000 K et 10 000 K, ce qui permet d'atomiser, d'ioniser et d'exciter la plupart des éléments. La torche à plasma permet de former efficacement des ions monoatomiques pour tous les éléments possédant une énergie d'ionisation supérieure à celle de l'argon (ceci exclut quelques éléments comme par exemple F, Ne, He...). C'est d'ailleurs la raison pour laquelle le fluor n'a pas été dosé par ICP-MS lors de nos expérimentations.

La mesure de l'uranium est faite à partir d'une gamme d'étalonnage en utilisant le bismuth comme témoin interne (1 µg/L), tel que décrit précédemment (Poisson et al. 2014). La limite de détection de l'appareil est de 0.5 ng/L pour  $^{238}\text{U}$  et de 0.01 ng/L pour  $^{235}\text{U}$ . Le calcul du rapport isotopique permet de s'assurer de la non-contamination des groupes témoins, avec un pourcentage en  $^{235}\text{U}$  d'environ 0.25 pour l'uranium naturel, et d'environ 0.72 pour l'uranium appauvri.

#### *β. Dosage de l'uranium dans les urines*

L'uranium urinaire est mesuré directement après une dilution, allant de 200 (pour les témoins) à 400'000 (pour les groupes traités).



### *γ. Dosage de l'uranium tissulaire*

Les tissus subissent préalablement une étape de minéralisation. Ainsi, 8mL d'acide nitrique 70% et 2mL de peroxyde d'hydrogène sont ajoutés aux échantillons, puis la minéralisation est réalisée dans un four à micro-ondes de 1 000 W (Ethos Touch, Milestone Microwaves Laboratory Systems, Bergamo, Italy) selon le programme suivant : 20 minutes de montée progressive en température, puis 10 minutes à 180°C. Les minéralisats sont récupérés dans des flacons avec de l'acide nitrique, avant que ce dernier ne soit évaporé sur plaque chauffante à une température maximale de 70°C. Les minéralisats sont repris dans 10 mL d'acide nitrique à 20%, puis, en fonction de la concentration attendue en uranium, sont à nouveau dilués, avec un facteur de dilution allant entre 25 (pour les témoins) et 400 (pour le groupe des animaux contaminés pendant 6 mois à 40 mg/L puis injectés avec 5 mg/kg d'uranium).

#### b. Dosage du fluor

La quantité de fluor accumulée est mesurée au niveau tissulaire et urinaire par potentiométrie, à l'aide d'une électrode sélective d'ions (Thermo Scientific Orion, Villebon-sur-Yvette, France). La mesure du fluor est faite à partir d'une gamme d'étalonnage de fluor, allant de 0.01 à 10 mg/L, et réalisée à partir d'une solution mère de fluor (Fluoride ISE Calibrating Solution, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France).

### *α. Dosage du fluor dans les urines*

Différentes dilutions ont été testées afin d'avoir des mesures dans notre gamme d'étalonnage (depuis des urines pures, jusqu'à une dilution 100). De plus, des essais de lectures au potentiomètre ont été faits avec ou sans TISAB, mais aucune différence entre les résultats obtenus n'a été constatée. Au final, tous les échantillons d'urines ont été dilués au 25<sup>ème</sup> avant lecture au potentiomètre, sans TISAB.

### *β. Dosage du fluor tissulaire*

En s'appuyant sur la méthode utilisée par Inkielewicz (I Inkielewicz 2003a; I Inkielewicz 2003b), nous avons souhaité réaliser la métrologie tissulaire du fluor après calcination. La moitié de rein servant à la métrologie tissulaire est placée dans un creuset en platine (Fisher Scientific, Illkirch, France), puis 1 mL de solution d'acétate de magnésium à 5% (Fisher Scientific, Illkirch, France) est ajouté. L'échantillon est séché à 105°C durant 12 heures avant qu'une pyrolyse de 24 heures ne soit effectuée dans un four chauffé à 500°C. Une fois l'échantillon refroidi, le creuset est rincé par des lavages successifs d'acide perchlorique (Fisher Scientific, Illkirch, France), de solution de citrate de sodium 1M (Fisher Scientific, Illkirch, France) et de TISAB buffer (pH=5.2). Le contenu récupéré par les lavages est alors dosé par potentiométrie, comme lors des dosages urinaires.

Cette méthode n'a pas permis d'établir une différence significative entre les animaux témoins et les traités, du fait que les témoins aient déjà un niveau basal de fluor assez élevé dans le rein. Par conséquent cette méthode n'a pas été retenue pour doser le fluor dans nos modèles expérimentaux.

**Tableau 5a : Séquences des amorces de gènes évalués avec la méthode SYBR**

Gène	Numéro d'ordre	Sens	Anti-sens
HPRT	NM_013556	TGCTGCGTCCCCAGACTTTTG	AGATAAGCGACAATCTACCAGAGG
GAPDH	GU214026	TCCACTCACGGCAAATTCACG	TAGACTCCACGACATACTCAGC
B2M	NM_009735	CACTGACCGGCTGTATGCT	GGTGGGTGGCGTGAGTATACTT
BAX	NM_007527	CCCCCGAGAGGTCTTCTT	GCGGCCCCAGTTGAAGT
BCL2	NM_009741	TGGGATGCCTTTGTGGAAGT	CAGAGACAGCCAGGAGAAAATCAA
CASP3	NM_001284409	CTGGACTGTGGCATTGAGACA	GCCTCCACCGGTATCTTCTG
CLU	AF182509	TCGGGCATCTGGCATCA	AAGCTCACGGGCGAAGAAC
CST3	NM_009976	GCGTTGGACTTCGCTGTGA	GGCTGTGGTACGCATCGTT
Cu, Zn SOD	NM_011434	TGGTGGTCCATGAGAAACAA	GTTTACTGCGCAATCCCAAT
GSTA1	NM_008181	GACTGTGAGCTGAGTGGAGAAGAA	CCGGCCATTGCAGCAA
HO-1	NM_010442	CTGTGAACTCTGTCCAATG	AACTGTGTCAGGTATCTCC
ICAM-1	NM_010493	CACCCCAAGGACCCCAAGGAGAT	CGACGCCGCTCAGAAGAACCAC
KIM-1	BC053400	TTTCAGGCCTCATACTGCTTCTC	TGACCCACCACCCCTTTT
Mn SOD	NM_013671	ACACATTAACGCGCAGATCA	AATATGTCCCCACCATTGA
NEIL1	NM_001357409	CCACGCCCATCTAACGTTTTT	CGGATGTCTACGAAGCAAAGG
NGAL	NM_008491	CGGGACCTGGTACCTCGAT	CCATTTTCTCAATGCGAGTCA
Nrf2	NM_010902	CGAGATATACGCAGGAGAGGTAAGA	GCTCGACAATGTTCTCCAGCTT
OGG1	NM_010957	AACAACAACATTGCTCGCATTACT	GCTGAATGAGTGCAGGTCCAA
OPN	AF515708	CCCTCGATGTCATCCCTGTT	TTCCGTTGTTGCTGATCAGA
VCAM-1	BC029823	TCGCGGTCTTGGGAGCCTCA	TGACCGTGACCGGCTTCCCA

**Tableau 5b : Gènes évalués avec la méthode Taqman**

Gène	Numéro d'ordre	Identité d'essai Taqman
ACTB	NM_007393.5	Mm02619580_g1
HPRT	NM_013556.2	Mm03024075_m1
GAPDH	NM_001289726.1	Mm99999915_g1
AMPK	NM_001013367.3	Mm01296700_m1
ATF4	NM_001287180.1	Mm00515325_g1
ATF6	NM_001081304.1	Mm01295319_m1
Beclin1	NM_019584.3	Mm01265461_m1
DRAM1	NM_027878.2	Mm00503627_m1
DRAM2	NM_001025582.2	Mm00509019_m1
GRP78	NM_001163434.1	Mm00517691_m1
GRP94	NM_011631.1	Mm00441926_m1
IRE1- $\alpha$	NM_023913.2	Mm00470233_m1
LC3B	NM_026160.4	Mm00782868_sH
PERK	NM_010121.2	Mm00438700_m1
Sestrin2	NM_144907.1	Mm00460679_m1

### 3. Dosage des paramètres de biochimie clinique

La mesure des paramètres biochimiques urinaires (créatinine, urée, protéines totales, glucose, calcium, potassium, phosphore, et sodium) a été faite avec l'automate Konelab 20 (ThermoScientific, Courtabœuf, France). Tous les réactifs proviennent de Thermo Fisher Scientific Electron (Asnières, France).

### 4. Techniques de quantification de l'expression génique

#### a. Extraction des ARN messagers tissulaires

Des morceaux de reins de 20 à 30 mg ont été découpés à partir des tissus conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$ , puis ont été mis dans des tubes à ribolyse (Lysing Matrix D, MP Biomedicals, réf. 6913-100) avec un tampon de lyse à 1% de  $\beta$ -mercaptoéthanol. Les échantillons ont été lysés grâce à un ribolyseur (Ozyme, Saint-Cyr-l'École, France), puis l'extraction de la totalité des ARNs a été réalisée avec le kit Total RNA isolation kit (Qiagen, Les Ulis, France), selon les instructions du fabricant.

La détermination de la concentration en ARN se fait par lecture de l'absorbance à 260 nm (NanoDrop One, Thermo Scientific™). La mesure du rapport DO 260/280 permet de vérifier la pureté des ARNs lorsqu'il est compris entre 1.75 et 2.00. Les ARNs sont conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### b. Rétro-transcription

La transcription inverse (RT) permet de synthétiser de l'ADN complémentaire (ADNc) à partir des ARNs, grâce à l'enzyme ARN Polymérase. Elle est réalisée en utilisant le kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems Life Technologies, Courtabœuf, France). Pour chaque puits, on dépose un volume total de  $10\mu\text{L}$  contenant  $1\mu\text{g}$  d'ARN dilué dans de l'eau dépourvue de RNase. Pour atteindre un volume final de  $20\mu\text{L}$  par puits,  $10\mu\text{L}$  de mix réactionnel contenant de l'eau sans RNase (42% v/v), du RT Buffer (20% v/v), des dNTPs (8% v/v), des amorces (20% v/v), et de la reverse transcriptase (10% v/v), sont ajoutés à chaque puits.

Les échantillons sont alors placés dans un thermocycleur (Thermo Hybaid PX2, Thermo Scientific) où ils sont incubés pendant 10 minutes à  $25^{\circ}\text{C}$ , puis 120 minutes à  $37^{\circ}\text{C}$  durant lesquelles la synthèse d'ADNc s'effectue grâce à l'enzyme, qui se retrouve ensuite dénaturée après une incubation à  $85^{\circ}\text{C}$  pendant 5 minutes. Une fois le cycle terminé, les échantillons sont conservés à  $4^{\circ}\text{C}$  dans le thermocycleur. Enfin, ils sont conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'à leur utilisation.

#### c. Réaction de polymérisation en chaîne en temps réel

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) semi-quantitative en temps réel a été utilisée pour déterminer l'expression des gènes dont les séquences et les numéros d'ordre sont reportés dans les **tableaux 5a et 5b**. Ces gènes ont été sélectionnés dans notre étude en tant que marqueurs de néphrotoxicité, ou en tant qu'acteurs impliqués dans les mécanismes de la réponse adaptative (apoptose, inflammation, stress oxydatif, dommages à l'ADN, autophagie, réponse UPR). Deux méthodes ont été appliquées afin de détecter les produits de PCR au fur et à mesure qu'ils s'accumulent : une détection par SYBR Green qui est une sonde fluorescente se liant à l'ADN double brin au fur et à mesure de sa synthèse, et la méthode de détection par Taqman utilisant en plus une sonde fluorogénique spécifique du gène cible.

**Tableau 6 : Composition de l'Hypotonic Lysis Buffer**

<b>HypotonicLysis Buffer</b>		
<b>Composant</b>	<b>Molarité ou Concentration</b>	<b>Quantité (mg) pour 100 mL</b>
HEPES	25 mM	600
MgCl <sub>2</sub>	5 mM	47.6
EDTA	1 mM	29.24
Pefabloc	1 mM	24
Pepstatin	1 µg/mL	0.1
Leupeptin	1 µg/mL	0.1
Trypsininhibitor	1 µg/mL	0.1

Pour ces deux méthodes, la RT-PCR a été réalisée avec une concentration finale de 1 ng/μL d'ADNc, dans un volume total de 10μL par puits. Avec la méthode SYBR, les puits contiennent 4 μL d'ADNc et 6 μL de mix, composé d'eau stérile (14.5% v/v), d'amorces sens et anti-sens (2.5% v/v, Fisher Scientific, Illkirch, France) et de Power SYBR® Green Master Mix (83% v/v, Fisher Scientific, Illkirch, France). En revanche, avec la méthode Taqman, chaque puits contient 4 μL d'ADNc, 0.5 μL d'eau stérile, 0.5 μL du mix contenant les amorces sens et anti-sens ainsi que la sonde, et 5 μL de la sonde Taqman (Life Technologies, Villebon-sur-Yvette, France).

L'amplification et la détection des produits PCR sont réalisées avec l'appareil QuantStudio™ 12K Flex (Applied Biosystems Life Technologies, Villebon-sur-Yvette, France). Quelle que soit la méthode utilisée (SYBR ou Taqman), le programme est le suivant : 50°C pendant 2 minutes, puis 95°C pendant 10 minutes pour activer l'ADN Polymérase, puis enfin 40 cycles d'amplification comprenant chacun 15 secondes de dénaturation à 95°C et une minute d'hybridation-élongation à 60°C. Les montées et baisses en température sont faites à la vitesse de 1.6°C par seconde.

Une fois les courbes d'amplification et les Ct obtenus, la méthode de comparaison des  $\Delta\Delta Ct$  est utilisée pour quantifier l'expression de chaque gène, rapporté à la moyenne géométrique des valeurs Ct des gènes rapporteurs hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), et l'actine  $\beta$  (ACTB). Enfin, le taux d'induction de chaque gène d'intérêt a été calculé relativement au groupe témoin non-exposé.

### *5. Techniques de mesure des activités enzymatiques des caspases 3/7*

L'activité des caspases 3/7 est mesurée avec le kit « Caspase-Glo®3/7 » (réf. G-8091, Proméga, Charbonnières, France) ou avec le kit « ApoTox-Glo™ Triplex Assay » (réf. G-6320, Proméga, Charbonnières, France), qui permet également la mesure de la viabilité et de la mortalité cellulaire. Ce kit a été élaboré pour des analyses sur cellules en culture, et nous l'avons adapté pour réaliser des analyses sur protéines extraites à partir de tissus rénaux murins, comme décrit ci-dessous :

Des morceaux de reins de 20 à 30 mg ont été découpés à partir des tissus conservés à -80°C, puis ont été mis dans des tubes eppendorf de 1.5 mL maintenus sur glace, avec 250 μL de Hypotonic Lysis Buffer, dont la composition est décrite dans le **tableau 6**.

Les morceaux de reins sont broyés, puis centrifugés à 4°C durant 15 minutes à 13 000 rpm. Le surnageant est récupéré, puis dilué au 1/5 dans de l'Hypotonic Lysis Buffer, puis les instructions du fournisseur sont suivies. La lecture de fluorescence a été réalisée avec l'appareil infinite M200 PRO (Tecan, Lyon, France) et la lecture de luminescence avec l'appareil Mithras LB 940 (Berthold Technologies, Thoiry, France).

Afin de rapporter les résultats obtenus à la quantité de protéines, un dosage de Bradford (Protein Assay, BioRad, Marnes-la-Coquette, France) a été réalisé en plaque 96 puits, après une nouvelle dilution des échantillons au 1/10 dans l'Hypotonic Lysis Buffer. Une courbe étalon d'albumine de sérum bovin, allant de la concentration de 0.0313 à 2 mg/mL, sert de référence pour déterminer la concentration protéique en fonction de l'absorbance.



**Tableau 7 : Les différentes étapes de déshydratation des échantillons biologiques**

<b>Solution</b>	<b>Temps (minutes)</b>
Formol	10
Ethanol 80°	10
Ethanol 80°	25
Ethanol 95°	10
Ethanol 95°	25
Ethanol 100°	25
Butanol	15
Butanol	15
Toluène	40
Xylène	40
Paraffine	15
Paraffine	30
Paraffine	60
Paraffine	90

### 6. Dosage ELISA

#### a. KIM-1

Le dosage urinaire de KIM-1 a été effectué chez la souris en utilisant le kit « Mouse TIM-1/KIM-1/HAVCR DuoSet » (réf. DY817 DuoSet, R&D Systems Europe, Lille, France), en respectant les instructions du fournisseur. Les urines ont été préalablement diluées dans de l'eau ultra pure avec des facteurs de dilution allant de 1/10 pour les témoins jusqu'à 1/100 pour certains groupes traités. Ces dilutions ont été déterminées après avoir effectué des tests sur des échantillons provenant de différents groupes d'animaux.

#### b. CLU

Le dosage urinaire de CLU a été effectué chez la souris en utilisant le kit « Quantikine ELISA Mouse Clusterin » (réf. MCLU00, R&D Systems Europe, Lille, France), en respectant les instructions du fournisseur. Les urines ont été préalablement diluées au 1/100 dans de l'eau ultra pure.

#### c. Calcul et expression des résultats

La lecture de plaque se fait à une longueur d'onde de 450 nm, avec une correction à 540 nm, et ce pour les deux dosages KIM-1 et CLU. Les résultats bruts obtenus sont alors des densités optiques, auxquelles nous avons soustrait la valeur du blanc. Avec les nouvelles valeurs obtenues, nous avons alors calculé la concentration de notre protéine d'intérêt à l'aide de gammes, allant de 31.3 pg/mL à 2 000 pg/mL pour KIM-1, et de 0.781 ng/mL à 50 ng/mL pour CLU.

### 7. Analyses histologiques

Une partie des mises au point et analyses histologiques réalisées durant cette thèse ont fait l'objet d'un stage de licence professionnelle en alternance (Laurine Conquet, ESTL, Paris V), d'une durée d'un an, (2017 -2018). Nous avons effectué les immunomarquages sur les deux protocoles *in vivo* précédemment décrits (protocole de traitement aigu, protocole de contamination chronique)

#### a. Préparation et déshydratation des échantillons

Les échantillons prélevés lors des euthanasies sont placés dans le formaldéhyde 4% sur une période de 24 heures. Ils ont ensuite été mis en cassette afin de subir une déshydratation, puis une imprégnation en paraffine dans un automate (Tissue-Tek VIP, Sakura, Villeneuve d'Ascq, France) dont les étapes sont listées dans le **tableau 7**. En résumé, la déshydratation permet de remplacer l'eau présente dans le tissu par de l'alcool, qui sera ensuite substitué par du toluène avant d'être lui-même remplacé par de la paraffine qui permet la conservation du tissu dans le temps.

#### b. Inclusion des tissus dans des blocs de paraffine et coupes histologiques

Après la déshydratation, les tissus sont inclus dans des blocs de paraffine chaude, puis les blocs sont déposés sur une plaque refroidissante, entre 0 et 4°C. Des coupes de 5 µm d'épaisseur sont alors effectuées grâce à un microtome (ThermoScientific microm HM340E, Courtabœuf, France) puis dépliées dans un bain-marie à 37°C. Les coupes de tissus sont ensuite déposées sur des lames en verre, avant d'être mises à sécher pendant 24 heures, dans une étuve à 37°C. Une fois sèches, les

**Tableau 8 : Méthode de calcul du score global et du pourcentage des lésions rénales**

Score de chaque type de lésion (1 à 4)		Score tubulaire/glomérulaire		Répartition de chaque type de lésion (%)	
Glomérulosclérose	1 (minimal)	Score glomérulaire	SOMME = 3	Glomérulosclérose	100 x 1/3 = 33,3
Dilatation cystique glomérulaire	2 (léger)			Dilatation cystique glomérulaire	100 x 2/3 = 66,7
Nécrose tubulaire	4 (sévère)	Score tubulaire	SOMME = 9	Nécrose tubulaire	100 x 4/9 = 44,4
Régénération tubulaire	3 (modéré)			Régénération tubulaire	100 x 3/9 = 33,3
Inflammation interstitielle	1 (minimal)			Inflammation interstitielle	100 x 1/9 = 11,1
Fibrose interstitielle	1 (minimal)			Fibrose interstitielle	100 x 1/9 = 11,1

**Tableau 9 : Étapes des immunomarquages de KIM-1, LC3-II, IRE1- $\alpha$ , ICAM, VCAM et  $\gamma$ -H<sub>2</sub>AX**

Étapes	Protéines d'intérêt					
	KIM-1	LC3-II	IRE1- $\alpha$	ICAM	VCAM	$\gamma$ -H <sub>2</sub> AX
Déparaffinage	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Triton X-100
Démasquage	2x5 min (750W) Tampon citrate	2x5 min (750W) Tampon Tris/EDTA	2x5 min (750W) Tampon citrate	2x3 min (750W) Tampon Tris/EDTA	2x3 min (750W) Tampon Tris/EDTA	2x5 min (500W) Tampon citrate
Lavages	2x5 min (DAKO)	2x5 min (DAKO)	2x5 min (DAKO)	2 min (DAKO)	2 min (DAKO)	2 min (DAKO)
Blocage	10 min	10 min	10 min	10 min	10 min	10 min
Anticorps primaire	Ab47635 1/200 1 nuit à 4°C	Ab192890 1/1500 1h à RT	NB100-2323 1/250 2h à RT	Ab119871 1/250 1h à RT	Ab134047 1/1000 1h à RT	Ab81299 1/2500 2h à RT
Lavages	2x5 min (DAKO)	2x5 min (DAKO)	2x5 min (DAKO)	3x3 min (DAKO)	3x3 min (DAKO)	3x3 min (DAKO)
Anticorps secondaire	ab150061 1/1000 45 min à RT	ab150061 1/1000 45 min à RT	ab150061 1/1000 45 min à RT	HRP F/414311F Pur 30 min à RT	HRP F/414341F Pur 30 min à RT	ab150061 1/1000 45 min à RT
Lavages	3x3 min PBS	3x3 min PBS	3x3 min PBS	3x3 min (DAKO)	3x3 min (DAKO)	3x3 min (DAKO)
Dernières étapes	Montage des lames	Montage des lames	Montage des lames	Révélation DAB QUANTO 5 min Contre-coloration	Révélation DAB QUANTO 5 min Contre-coloration	Coloration DAPI Montage des lames

lames sont transparisées, c'est-à-dire qu'elles sont déposées sur une plaque chauffée à 56°C afin de faire fondre la paraffine pour une meilleure adhésion à la lame de verre.

### c. Déparaffinage des lames et coloration Hématoxyline-Éosine-Safran

Les lames sont d'abord déparaffinées, puis une coloration Hématoxyline-Éosine-Safran (HES) est effectuée par un automate (Tissue-Tek PRISMA Plus, DRS 601, Sakura). Les étapes du déparaffinage et de la coloration sont listées dans l'**annexe 1**.

Les premiers bains de xylène permettent de déparaffiner les lames, tandis que les bains décroissants d'éthanol permettent de réhydrater les tissus. Lors de la coloration HES, l'Hémalun, qui est chargé positivement, va se lier à la chromatine nucléaire qui est chargée négativement, et va ainsi conférer une teinte bleue violacée aux noyaux cellulaires. Le colorant-neutralisant qu'est l'érythrosine va colorer dans différentes nuances les fibres tissulaires, les cytoplasmes et des produits extracellulaires en leur donnant une teinte rose à rouge. La dernière étape de la coloration HES est celle du safran, qui se lie au collagène et au tissu conjonctif tout en leur donnant une teinte jaune orangée.

### d. Lecture histologique des lames

Les lames ont été lues et scorées en aveugle par un laboratoire d'anatomopathologie indépendant (Biodoxis, Romainville, France). Les atteintes glomérulaires ont été déterminées à partir de la présence de glomérulosclérose et de dilatation cystique glomérulaire, tandis que les atteintes tubulaires ont été quantifiées à partir de la présence de nécrose, de régénération et de dilatation tubulaire, d'inflammation interstitielle, et de fibrose. Chaque type de lésions a été scoré de 0 à 4 pour une lame, et le total obtenu en additionnant le score de tous les types de lésions donne le score global de l'atteinte rénale. Le score de chaque lésion, en comparaison du score global, permet de déterminer le pourcentage que représente chaque type de lésion dans l'atteinte rénale induite chez les animaux. Les différents critères d'évaluation permettant de scorer les lames sont répertoriés dans l'**annexe 2**, et la méthode de calcul du score global et du pourcentage que représente chaque lésion dans l'atteinte rénale est décrite dans le **tableau 8**.

### e. Immunomarquages de KIM-1, LC3B, IRE1- $\alpha$ , ICAM, VCAM et $\gamma$ -H<sub>2</sub>AX

#### *$\alpha$ . Étapes de l'immunomarquage*

Les étapes des immunomarquages sont détaillées dans le **tableau 9**, avec des protocoles différents, en fonction des protéines d'intérêt étudiées. Les différents produits utilisés sont référencés en **annexe 3**.

Premièrement, les coupes sont déparaffinées et réhydratées dans des bains avec des gradients décroissants d'éthanol ainsi qu'une étape dans l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dilué à 3% dans le PBS afin de bloquer l'activité peroxydase endogène. Les étapes du déparaffinage dans l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sont indiquées dans l'**annexe 4**. Ensuite, une étape de démasquage des sites antigéniques est réalisée au four à micro-ondes, dans un tampon citrate pH=6, ou dans un tampon Tris/EDTA pH=9. Les lames sont ensuite laissées à refroidir pendant 20 minutes. Un léger filet d'eau coule ensuite pendant 10 minutes dans le bac contenant les lames, sans être directement dirigé sur celles-ci, afin de continuer à refroidir les échantillons tout en enlevant progressivement le tampon de démasquage. Après plusieurs lavages successifs, les échantillons sont incubés 10 minutes avec une solution de blocage pour éviter les marquages des

**Tableau 10 : Étapes de la contre-coloration à l'hémalum de Mayer**

<b>Contre-coloration à l'Hémalum de Mayer</b>	
<b>Solution</b>	<b>Temps</b>
Eau distillée	2 minutes
Hemalun de Mayer	5 secondes
Eau distillée	2 minutes
Eau distillée	2 minutes
Eau ammoniacuée à 4%	15 secondes
Eau courante	7 minutes
Eau distillée	2 minutes
Ethanol 100°	3 minutes
Ethanol 100°	3 minutes
Xylène	3 minutes
Xylène	3 minutes

**Tableau 11 : Score de l'immunomarquage de LC3-II**

<b>Lésions rénales</b>	<b>Scores</b>
<b>Nombre de tubules marqués / champ</b>	
Non détectable	0
< 30 % des tubules	1
Entre 30 et 60 % des tubules	2
> 60 % des tubules	3
<b>Nombre moyen de cellules marquées / tubule</b>	
Non détectable	0
< 30 % des cellules	1
Entre 30 et 60 % des cellules	2
> 60 % des cellules	3
<b>Nombre moyen de spots / cellule</b>	
Non détectable	0
1 spot	1
2 à 3 spots	2
> 3 spots	3

sites aspécifiques. Les lames sont ensuite incubées avec un anticorps primaire, puis les échantillons sont lavés afin de ne garder que les anticorps spécifiquement liés à notre protéine d'intérêt. Les échantillons sont ensuite incubés avec un anticorps secondaire dirigé contre l'espèce d'origine de l'anticorps primaire. Et un nouveau lavage est effectué afin de ne garder que les anticorps secondaires spécifiquement liés à notre anticorps primaire.

Dans le cas des protéines KIM-1, LC3B et IRE1- $\alpha$ , les lames sont finalement montées entre lame et lamelle, avec un milieu de montage Vectashield antifade mounting medium (Eurobio Scientific, Les Ulis, France).

Dans le cas des molécules CAMs, une étape de révélation est réalisée avec du DAB liquide QUANTO (réf. F/TA-060-QHD, MM France, Brignais, France) durant 5 minutes, avant qu'une contre-coloration à l'Hémalum de Mayer soit faite à l'aide d'un automate (Tissue-Tek PRISMA Plus, DRS 601, Sakura), selon les étapes décrites dans le **tableau 10**.

Enfin, les lames marquées avec  $\gamma$ -H<sub>2</sub>AX sont colorées au DAPI afin de visualiser les noyaux. Pour ce faire, les lames sont incubées 5 minutes dans une solution préparée à partir d'une poudre (D1306-10mg, Invitrogen), et dont la concentration finale est de 572 nM. Les lames sont finalement montées entre lame et lamelle, avec un milieu de montage Vectashield antifade mounting medium (Eurobio Scientific, Les Ulis, France).

### *$\beta$ . Quantification in situ de nos protéines d'intérêt*

L'acquisition des lames est faite au microscope LEICA DM 4000B (LEICA, Paris, France), avec un minimum de 10 clichés photographiques par animal. La quantification de la fluorescence (pour KIM-1, LC3B et IRE1- $\alpha$ ) et de la coloration (pour les CAMs) a été faite de manière semi-automatique, en scoring, ou en comptage manuel.

### *Semi-quantification automatique de KIM-1, ICAM et VCAM*

Une semi-quantification paramétrée du marquage de KIM-1 et des molécules CAMs a été faite avec un logiciel d'analyse d'image Histolab (version 8.12, Microvision Instruments, Lisses, France). Ainsi, la surface marquée pour chaque champ est quantifiée et rapportée à la surface totale du champ.

### *Scoring de LC3B*

Pour le marquage de LC3B, un score a été fait manuellement, en prenant en compte le nombre de tubules marqués par champ, le nombre de cellules marquées par tubule et le nombre de spots par cellule, comme décrit dans le **tableau 11**.

### *Quantification d'IRE1- $\alpha$*

Pour le marquage d'IRE1- $\alpha$ , un comptage manuel du nombre de tubules fluorescents (exprimant alors la protéine) a été effectué champ par champ. Le nombre de tubules total du champ a également été compté, puis un rapport du nombre de tubules fluorescents sur le nombre de tubules total a été calculé pour chaque champ.



### *Quantification de $\gamma$ -H<sub>2</sub>AX*

Dans le cas de l'immunomarquage de  $\gamma$ -H<sub>2</sub>AX, l'acquisition était faite en collaboration avec un autre laboratoire de l'IRSN spécialisé dans les dommages à l'ADN radio-induits. Les acquisitions ainsi que le comptage des foyers  $\gamma$ -H<sub>2</sub>AX se font grâce au logiciel Metafer4 (Metacyte).

### **III. Les expérimentations *in vitro***

#### **A. Modèle cellulaire**

Les cellules HK-2 (human kidney-2) sont des cellules humaines issues des TCP (Ryan et al. 1994). Cette lignée cellulaire est issue du cortex rénal d'un homme adulte sain. Les segments des TCP ont été isolés, puis exposés à un rétrovirus recombinant contenant les gènes E6/E7 du papillomavirus humain donnant ainsi naissance à cette lignée cellulaire. Ces cellules sont adhérentes et présentent une morphologie épithéliale, tout en maintenant un phénotype bien différencié de cellules de TCP. Les cellules HK-2 expriment notamment l'alcaline phosphatase (PAL), la gamma glutamyltransférase (GGT) et l'acide phosphatase (AP).

Cette lignée cellulaire est un modèle très utilisé lors de nombreuses études de toxicologie cellulaire (Gunness et al. 2010; Sohn et al. 2013), y compris lors d'exposition à l'uranium ou au fluor (Bao et al. 2013; Hao et al. 2014; Suhard et al. 2018; Zager and Iwata 1997).

#### **B. Préparation du milieu de culture cellulaire et des traitements**

##### **Composition du milieu de culture**

Pour la culture de la lignée HK-2, un milieu Advanced DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Ham's F-12) est utilisé (réf. 12634-010, Gibco, Thermo Fisher Scientific) enrichi à 5 % en sérum de veau fœtal (SVF, réf. 10270, lot 41Q9248K, Life Technologies) préalablement décomplémenté au bain-marie (30 minutes à 56°C), puis filtré et stérilisé (0.22  $\mu$ m). Le milieu est aussi enrichi avec 1 % de L-glutamine (réf. 25030, Life Technologies), et 2 % de solution de pénicilline/Streptomycine 10 000 U/mL (PS, réf. 15140-122, Life Technologies).

##### **Préparation des milieux contaminés**

Dans le cas des contaminations cellulaires à l'uranium, la poudre de cristaux de nitrate d'uranyle (PM : 518 g/mol) est dissoute dans une solution de bicarbonate de sodium (PM : 84 g/mol ; pH = 8.1) à raison de 5 mg de poudre d'UA dans un millilitre de bicarbonate à 100 mM. La solution mère obtenue est donc à une concentration de 10 mM et est ensuite filtrée (0.22  $\mu$ m) avant d'être ajoutée au milieu de culture de manière à obtenir nos concentrations finales. L'uranium étant dissout dans du bicarbonate de sodium afin d'être neutralisé, les témoins correspondants à ces expérimentations possèdent également du bicarbonate de sodium dans leur milieu de culture.

Dans le cas des contaminations au fluor, la poudre de NaF (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) est pesée et directement diluée dans du milieu de culture pour faire une solution mère. Cette solution mère est alors utilisée pour obtenir nos différentes concentrations finales.



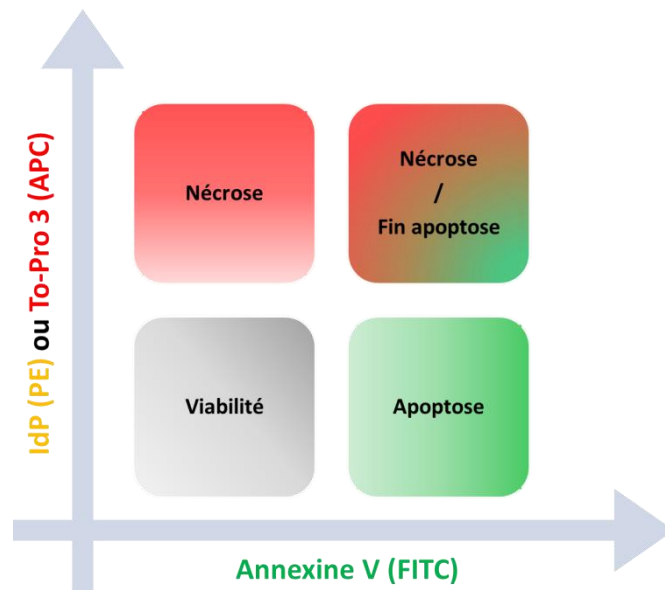


Figure 35 : Méthode de lecture des graphes obtenus en cytométrie en flux

### Traitement à la staurosporine

Les traitements à la staurosporine (réf S5921-1mg, Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) sont connus pour induire l'apoptose, et sont donc utilisés comme contrôles positifs dans les études menées avec le FACS ou le dosage des activités caspases (cf. ci-après). Des concentrations allant de 1 nM à 10 µM ont été testées.

### C. Analyses FACS

#### Principe

La méthode FACS est utilisée pour étudier le pourcentage de cellules en nécrose ou en apoptose, grâce à l'utilisation d'un kit (BD Pharmingen™ FITC Annexin V apoptosis detection kit, réf. 556547, BD Biosciences, Rungis, France).

Des études précédentes ont déjà étudié l'apoptose par la méthode FACS sur la lignée cellulaire HK-2 (Ding et al. 2012; Gu et al. 2016). Afin d'étudier ce mécanisme, nous avons donc marqué les cellules en apoptose par l'annexine V, avec l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) qui possède un pic d'excitation et d'émission à 495 nm et 521 nm respectivement. Les cellules en nécrose ont également été marquées, soit avec l'iodure de propidium (IdP), le marqueur le plus classiquement utilisé pour identifier les cellules en nécrose par FACS, soit avec To-Pro 3.

Les marquages obtenus grâce à la méthode FACS se lisent tel qu'indiqué en **figure 35** :

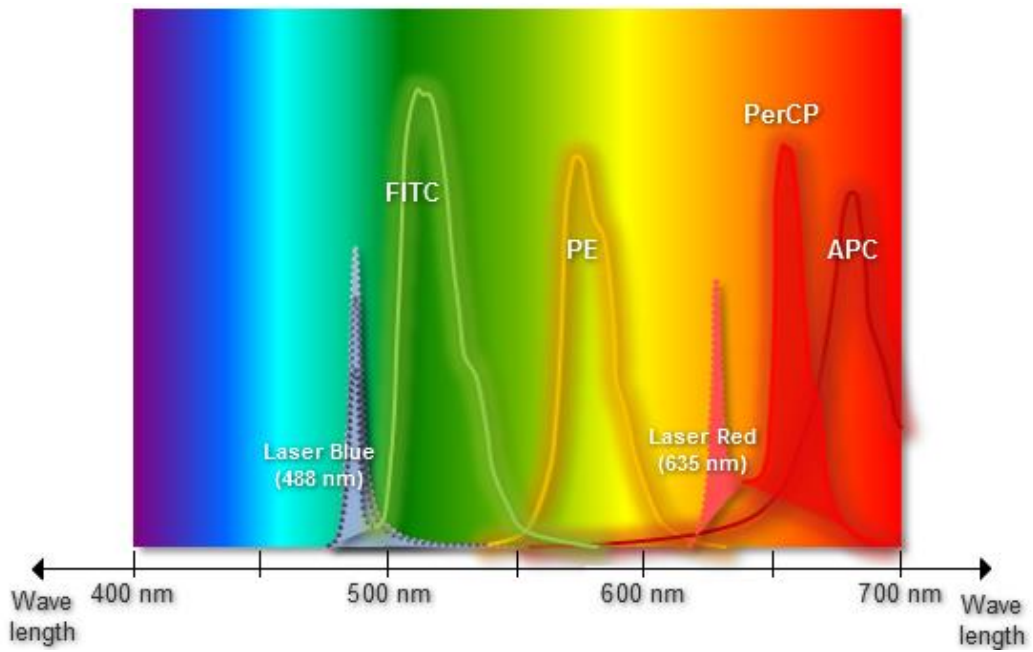
- Les cellules vivantes sont IdP (ou ToPro3) négatives et Annexine V négatives
- Les cellules en nécrose sont seulement positives pour le marquage IdP ou ToPro3
- Les cellules en apoptose sont seulement positives pour le marquage Annexine V
- Les cellules en fin d'apoptose / nécrose sont positives pour les deux marquages Annexine V et IdP (ou ToPro3)

#### Protocole

Après avoir été traitées à l'uranium pendant 24 heures ou à la staurosporine pendant 5 heures, les cellules sont lavées au PBS 1X puis décollées avec de la trypsine (Trypsin-EDTA 0.25 %) pendant 3 à 4 minutes à 37°C. Une fois le tapis cellulaire décollé, la trypsine est neutralisée avec du milieu de culture, et la totalité de la flasque est récupérée pour être centrifugée à 1500 rpm pendant 5 minutes. Le surnageant est jeté et le culot cellulaire est récupéré (1 mL) pour un comptage en cellule de Malassez.

200 000 cellules sont prélevées par condition dans du PBS 1X, correspondant aux conditions suivantes :

- Témoin sans marquage
- Témoin avec un marquage nécrose (IdP ou To-Pro3)
- Témoin avec un marquage apoptose (Annexine V)
- Témoin avec double marquage
- Traitement avec double marquage



**Figure 36 : Spectres d'excitation et d'émission des différents fluorochromes utilisés en cytométrie en flux**

Les tubes sont centrifugés 7 minutes à 1500 rpm avant que le culot cellulaire ne soit repris dans 200  $\mu$ L de binding buffer. 5  $\mu$ L d'Annexin V et/ou d'IdP sont ajoutés dans chaque tube et ceux-ci sont incubés pendant 25 minutes dans le noir. Enfin, 300  $\mu$ L de binding buffer sont ajoutés (ainsi que 1  $\mu$ L de To-Pro3 dans le cas d'un marquage avec To-Pro3), avant que les tubes ne soient vortexés puis lus au FACS.

### Mises au point

Des premiers essais ont été menés avec les marquages Annexine V et IdP. Avant lecture au FACS, différents traitements à l'uranium (200 à 500  $\mu$ M) avaient été effectués sur 24 heures, ainsi qu'un traitement pro-apoptotique à la staurosporine sur 5 heures (0.1, 1 et 10  $\mu$ M). Les résultats n'ont montré aucune différence entre les sous-populations cellulaires marquées à l'Annexine V ou à l'IdP en comparaison des témoins. Pourtant, une activité apoptotique était détectée avec le dosage enzymatique des caspases 3/7 (décrit ci-après). La non détection de l'apoptose par la méthode FACS pourrait provenir du fait que l'IdP émet dans le spectre de la phycoerythrine (PE), et qu'il existe par conséquent un risque d'overlap entre FITC et PE (**figure 36**).

C'est pourquoi nous avons par la suite essayé d'identifier les cellules en nécrose avec le marqueur To-Pro 3. Il est associé à la sonde fluorochrome allophycocyanine APC et possède un pic d'excitation et d'émission à 650 nm et 660 nm, respectivement. Ce spectre se situe donc loin du pic de FITC et permet d'éviter un « overlap » entre les deux fluorochromes.

Nos résultats ne nous ayant pas permis de détecter de l'apoptose par la méthode FACS, des études enzymatiques de l'activité pro-apoptotique des caspases 3 et 7 ont été effectuées.

### D. Activités caspases 3/7

Nous mesurons l'activité des caspases 3/7 effectrices de l'apoptose dans nos cellules HK-2 après un protocole d'exposition aiguë au fluor, ou d'exposition prime + challenge d'uranium.

Dans le cas de l'exposition aiguë au fluor, les cellules sontensemencées dans une plaque 96 puits à raison de 6 000 cellules par puits. 48h après l'ensemencement, les cellules sont exposées à des concentrations de fluor de 0.5 à 2  $\mu$ M pendant 24h, avant lecture de l'activité enzymatique.

Dans le cas de l'exposition chronique prime suivie d'un traitement challenge à l'uranium, les cellules cultivées en flasque sont exposées durant 12 jours à 0, 10, 30 ou 50  $\mu$ M d'uranium, puis récupérées etensemencées dans une plaque 96 puits à raison de 10 000 cellules par puits. 24h après l'ensemencement, les cellules sont traitées avec 500  $\mu$ M d'uranium durant 24h, avant lecture de l'activité apoptotique.

Dans chaque protocole un groupe de cellules ne subit pas l'exposition prime mais est traité avec de la staurosporine, témoin positif d'induction apoptotique, à des concentrations de 0.1, 1 et 10  $\mu$ M durant 5 heures avant lecture de l'activité enzymatique.

L'activité des caspases 3/7 est mesurée avec le kit « Caspase-Glo<sup>®</sup>3/7 » (réf. G-8091, Proméga, Charbonnières, France), utilisé selon les instructions du fournisseur. La lecture de la luminescence est réalisée avec l'appareil Mithras LB 940 (Berthold Technologies, Thoiry, France).



### E. Dosages de la $\gamma$ -glutamyltransférase et de la phosphatase alcaline

La  $\gamma$ -glutamyltransférase (GGT) est une enzyme exprimée dans le rein, et plus précisément dans les cellules des TCP. Son activité augmente dans les cellules en souffrance, servant ainsi de marqueur phénotypique des cellules issues des TCP, telle que la lignée HK-2. La phosphatase alcaline (PAL) est également une enzyme exprimée dans les cellules rénales, mais à l'inverse la diminution de son activité est corrélée à des effets délétères dans l'organisme. La mesure de son activité dans les cellules HK-2 permet entre autre de connaître l'état de différenciation des cellules rénales.

L'activité de la PAL est quantifiée grâce à un kit de détection colorimétrique (réf. ab83369, Abcam, Cambridge, UK). Cette quantification est basée sur l'ajout d'un substrat para-nitrophénylphosphate (pNPP) dans le milieu des cellules, qui devient jaune une fois déphosphorylé par la PAL, et peut être détecté par une lecture d'absorbance à 405 nm.

L'activité de la GGT est également quantifiée grâce à un kit de détection colorimétrique (réf. MAK089, Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France). Cette dernière est basée sur le transfert du groupe  $\gamma$ -glutamyl depuis le substrat L- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide ajouté dans le milieu par la GGT. Cette réaction engendre la libération du chromogène *p*-nitroanilide et est détectable par une lecture d'absorbance à 405 nm.

### F. Immunomarquage de $\gamma$ -H<sub>2</sub>AX

Nos cellules HK-2 sontensemencées sur des LAB-TEK I sur lames plastiques séparables à 4 chambres de culture (réf. 055070, Dutscher, Brumath, France), à raison de 140 000 cellules par puits. 24 heures plus tard, les cellules sont traitées à l'uranium pendant 24 heures avant d'être lavées au PBS 1X puis fixées avec de la PFA 4% durant 5 minutes. Après quoi, deux lavages successifs au PBS 1X sont réalisés, puis les cellules sont perméabilisées au triton 0.1% durant 5 minutes. Une solution de blocage (réf. X0909, DAKO, Les Ulis, France) est appliquée sur le tapis cellulaire pendant 20 minutes puis retirée, sans rinçage. L'anticorps primaire (réf. ab81299, Abcam, Cambridge, UK) est incubé 2 heures après avoir été dilué d'un facteur 10 000. Les silicones des lames LAB-TEK sont alors retirés pour effectuer 3 lavages de 3 minutes dans un buffer (réf. 3006, DAKO, Les Ulis, France), avant que les cellules ne soient incubées avec un anticorps secondaire (réf. ab150061, Abcam, Cambridge, UK) dilué d'un facteur 4 000, durant 45 minutes. Enfin, les lames sont à nouveau lavées 3 fois 3 minutes dans le buffer, avant d'être montées avec un milieu de montage Prolong Gold avec DAPI (réf. P36931, Fisher Scientific, Illkirch, France). Toutes les étapes sont réalisées à température ambiante.

L'acquisition des lames est faite au microscope LEICA DM 4000B (LEICA, Paris, France).

## IV. Analyses statistiques

Tous les résultats sont exprimés sous la forme moyenne  $\pm$  l'écart-type à la moyenne (correspondant au terme anglais SEM *Standard Error of Mean*).

La majeure partie des analyses statistiques ont été faites avec le logiciel SigmaPlot 11.0 (Systat Software, Inc). Des analyses à un ou deux paramètres (One ou Two Way ANOVA) ont été réalisées afin de comparer chaque groupe, en appliquant la méthode de Holm-Sidak dans le cas des comparaisons multiples.



Dans le cas particulier des semi-quantifications d'immunohistochimie réalisées avec le logiciel histolab, un modèle statistique d'équation d'estimation généralisée (EEG) a été réalisé avec les logiciels R 3.4.4 et RStudio, afin de prendre en compte les variabilités intra-individuelles, en plus des variabilités interindividuelles (prises en compte lors d'une analyse paramétrée ANOVA).

Le seuil de significativité a été fixé à  $p < 0.05$ .

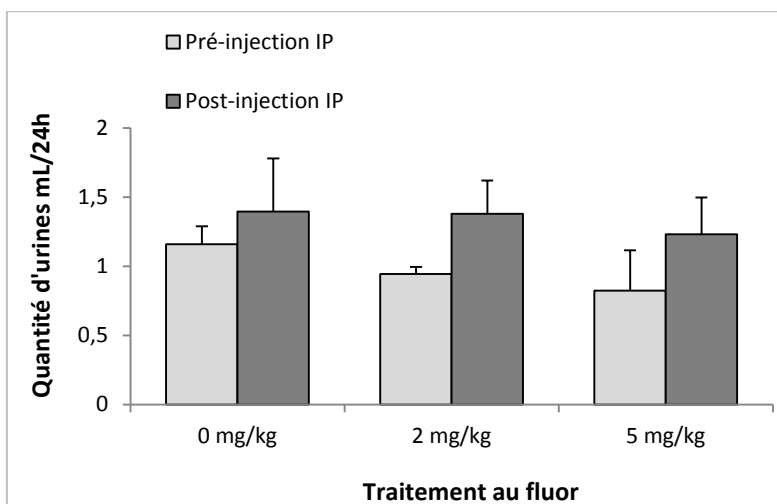




---

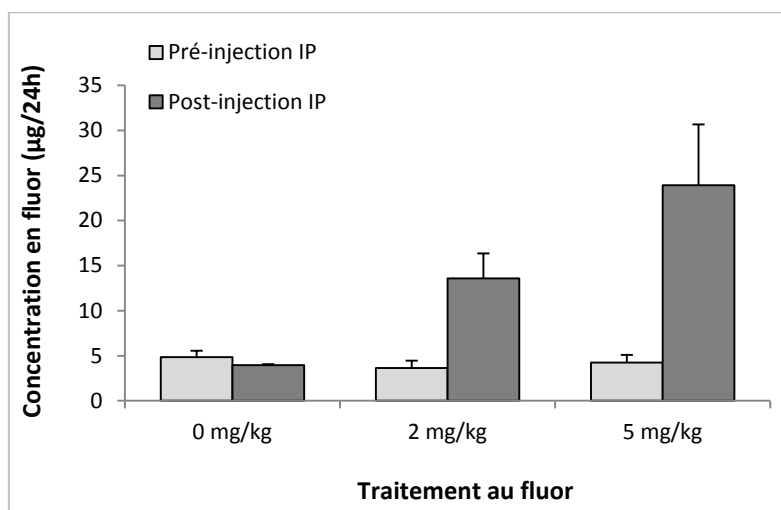
**RÉSULTATS**

---



**Figure 37 : Diurèse de souris traitées avec du fluor**

Le volume urinaire est récupéré sur une période de 24 heures, avant et après une injection IP de 0, 2, et 5 mg/kg de fluor (sous forme de NaF) chez la souris C57BL/6. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  l'écart-type à la moyenne (SEM). N=2 (0 mg/kg) ; N=4 (2 mg/kg) ; N=4 (5 mg/kg).



**Figure 38 : Métrologie du fluor dans les urines de souris traitées avec du fluor**

Le dosage du fluor dans les urines a été fait par potentiométrie (résultats en mg/L) puis a été rapporté à la quantité d'urine produite sur une période de 24 heures, avant et après une injection IP de 0, 2, et 5 mg/kg de fluor (sous forme de NaF) chez la souris C57BL/6. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. N=2 (0 mg/kg) ; N=4 (2 mg/kg) ; N=4 (5 mg/kg).

### I. Néphrotoxicité de l'uranium et du fluor après une injection aiguë chez la souris C57BL/6J

#### A. Étude expérimentale préliminaire sur le fluor

Du fait qu'il existe peu de données bibliographiques sur les expositions aiguës de fluor par injections chez la souris, et afin de pouvoir effectuer la métrologie du fluor, technique non utilisée jusqu'à aujourd'hui à l'IRSN, une étude préliminaire a été mise en place.

##### 1. Protocole

Un effectif total de 10 souris a été divisé en plusieurs groupes, recevant les traitements suivants :

- Injection IP avec du NaCl puis euthanasie 24 heures après (n=2)
- Injection IP avec 4.5 mg/kg de NaF (équivalent à 2 mg/kg de fluor), puis euthanasie 24 (n=2) ou 48 heures après (n=2)
- Injection IP avec 11 mg/kg de NaF (équivalent à 5 mg/kg de fluor), puis euthanasie 24 (n=2) ou 48 heures après (n=2)

Les doses de 2 et 5 mg/kg de fluor ont été sélectionnées à partir de la littérature (Dote et al. 2000b; Santoyo-Sanchez et al. 2013), et de l'expertise que détient le CINVESTAV quant à la néphrotoxicité du fluor chez la souris.

Pour récolter les urines, les animaux ont été mis en cage à métabolisme durant 48 heures, une première fois une semaine avant l'injection (pré-injection IP), puis une seconde fois directement après l'injection (post-injection IP). Durant le passage en cage à métabolisme, un premier prélèvement des urines a été effectué au bout de 24 heures, puis un second à la fin du passage en cage à métabolisme, 48 heures après injection IP.

##### 2. Diurèse

Les résultats de la diurèse sont présentés en **figure 37** et montrent que quel que soit le traitement les animaux ont tendance à excréter légèrement plus d'urine durant le second passage en cage à métabolisme même si l'effectif limité de cette étude ne permet pas de conclure sur une différence statistique. Pour les doses administrées, nous n'avons pas observé d'induction de la diurèse suite au traitement par le fluor.

##### 3. Métrologie du fluor dans les urines

La mise au point de dosage du fluor dans les urines a été effectuée lors de cette étude en utilisant les connaissances du CINVESTAV (O. Barbier) qui nous ont permis d'établir le protocole détaillé dans la partie Matériel et Méthodes. Des essais ont également été effectués avec ou sans TISAB, mais aucune différence n'ayant été observée, les dosages par potentiométrie ont été effectués sans TISAB par la suite.

Le taux basal de fluor dans les urines est en moyenne de 4.1 µg/24 heures. Les résultats présentés en **figure 38** montrent l'augmentation du taux de fluor dans les urines proportionnellement à la dose



administrée. Ceci nous a permis de valider notre protocole d'injection IP chez la souris bien que les différences observées ne soient pas significatives du fait du faible effectif de cette étude préliminaire.

La comparaison de la concentration en fluor des urines prélevées au bout de 24 heures et des urines issues du second prélèvement à 48 heures a également permis de constater que la majorité du fluor était excrété durant les premières 24 heures suivant l'injection.

#### *4. Métrologie du fluor dans les tissus*

En s'appuyant sur la méthode utilisée par Inkielewicz (I Inkielewicz 2003a; I Inkielewicz 2003b), nous avons souhaité réaliser la métrologie tissulaire du fluor après calcination.

Un premier essai a été réalisé avec une moitié de rein de souris, mais du fait de la faible quantité de tissu que cela représentait, la lecture par potentiométrie ne permettait pas de détecter la concentration en fluor dans le rein.

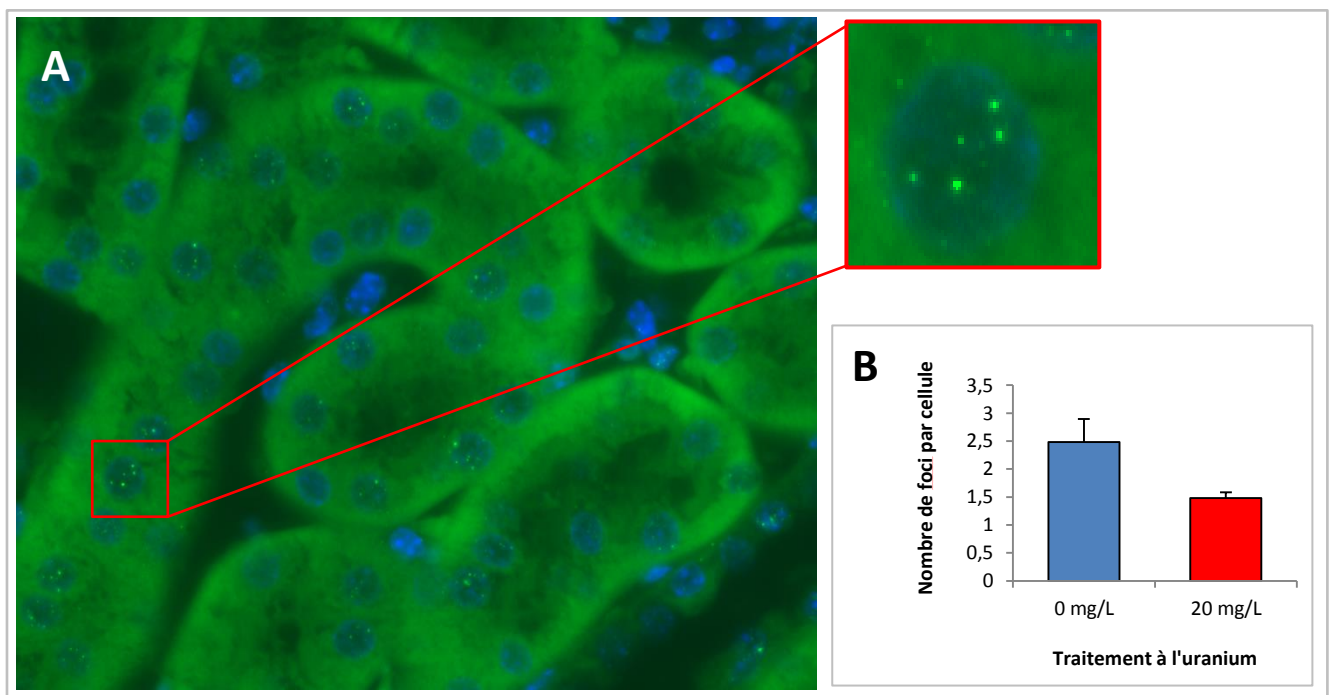
Les études d'Inkielewicz et al. étant réalisées chez le rat, ces derniers avaient effectivement plus de tissus, permettant ainsi la mesure du taux de fluor. Nous avons donc tenté de pooler 4 reins de souris ayant reçu le même traitement afin d'augmenter notre quantité de tissu à analyser. Cette méthode n'a pas permis d'établir une différence significative entre les animaux témoins et les traités, du fait que les témoins aient déjà un niveau basal de fluor assez élevé dans le rein.

Par conséquent, cette méthode n'a pas été retenue pour doser le fluor dans nos modèles expérimentaux.

#### *5. Conclusion*

Cette étude préliminaire nous a permis de mettre au point notre protocole de dosage du fluor dans les urines par potentiométrie, tout en validant notre protocole d'injection IP. Nous avons constaté que le fluor se retrouvait rapidement dans les urines, et ce principalement durant les premières 24 heures post-injection. Les quantités de fluor retrouvées durant les premières 24 heures après les injections IP de 2 et 5 mg/kg sont respectivement de 13.6 et 23.9  $\mu\text{g}/24\text{h}$ , ce qui correspond approximativement aux concentrations urinaires retrouvées chez des rats exposés depuis 40 jours à 15 et 50 mg/L de NaF dans l'eau de boisson (Cardenas-Gonzalez et al. 2013).

Étant donné le stress induit chez les souris après un passage de 48 heures en cage à métabolisme, et du fait que le fluor soit majoritairement retrouvé dans les urines après les premières 24 heures, nous avons décidé de réduire le temps de passage en cage à métabolisme à 24 heures pour les études expérimentales futures.



**Figure 39 : Dommages à l'ADN induits par une contamination à l'uranium chez des souris C57BL/6**

L'observation au microscope à fluorescence permet d'identifier des foci  $\gamma$ -H<sub>2</sub>AX dans les noyaux des cellules rénales (A) et de les quantifier (B) après une contamination chronique de 4 mois à l'uranium naturel (0 et 20 mg/L) chez la souris. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. N=3 (0 mg/L) et N=2 (20 mg/L).

### B. Test d'immunomarquage des CDB à l'ADN chez des souris C57BL/6J exposées à l'uranium ou au fluor

Les dommages à l'ADN faisant partie des mécanismes de toxicité décrits dans le cas d'exposition à l'uranium et au fluor, nous nous sommes intéressés à la quantification de  $\gamma$ -H<sub>2</sub>AX. Il s'agit en effet d'une phosphorylation de l'histone H<sub>2</sub>AX, première étape de la reconnaissance des CDB et du recrutement des protéines impliquées dans la réparation à l'ADN. La mesure de  $\gamma$ -H<sub>2</sub>AX est couramment utilisée en radiobiologie pour évaluer les dommages à l'ADN suite à une exposition externe aux rayonnements ionisants car il s'agit de l'un des marqueurs les plus sensibles chez l'Homme ou l'animal (Hall et al. 2017; Roch-Lefevre et al. 2010). Cependant, sa détection *in situ* dans le tissu rénal lors d'une exposition interne par des radionucléides nécessite un développement technique avant de pouvoir être appliqué. Pour ce faire, nous avons effectué une collaboration interne avec S. Roch-Lefevre (Laboratoire de Dosimétrie Biologique, IRSN) qui a initié le développement de ce dosage par l'intermédiaire d'un stage d'alternance (Licence Pro, A. Morat 2016).

#### 1. Test d'immunomarquage de $\gamma$ -H<sub>2</sub>AX chez des souris exposées à l'uranium

##### a. Protocole

La quantification de  $\gamma$ -H<sub>2</sub>AX a été faite *in situ*, après un immunomarquage dont le protocole est détaillé dans le matériel et méthodes. Les lames analysées étaient issues d'une étude expérimentale précédente d'exposition à l'uranium chez la souris C57BL/6J, menée lors d'une thèse achevée au laboratoire (Poisson 2013).

Trois groupes d'animaux de faibles effectifs ont été étudiés pour mettre au point cet immunomarquage :

- un groupe témoin de souris wild type (WT) non contaminées à l'uranium (n=3)
- un groupe de souris WT contaminées durant 4 mois à l'uranium naturel (20 mg/L) (n=2)

##### b. Résultats

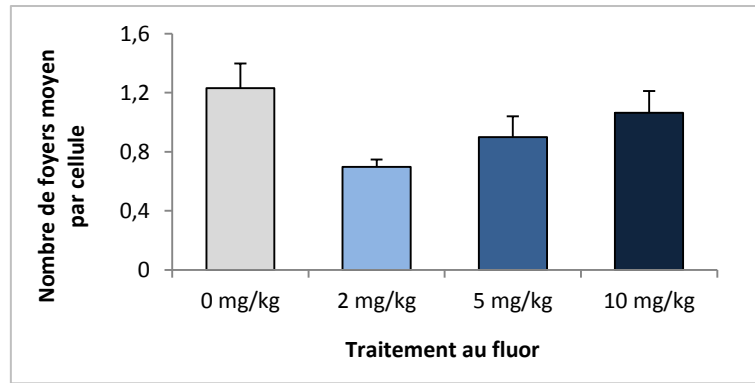
Bien que les effectifs de cet essai soient faibles pour émettre une conclusion, il semblerait qu'un traitement chronique de 20 mg/L d'uranium entraînerait une diminution du nombre de foyers présents dans les noyaux des cellules rénales, en comparaison avec le groupe contrôle (**figure 39**).

#### 2. Test d'immunomarquage de $\gamma$ -H<sub>2</sub>AX chez des souris exposées au fluor

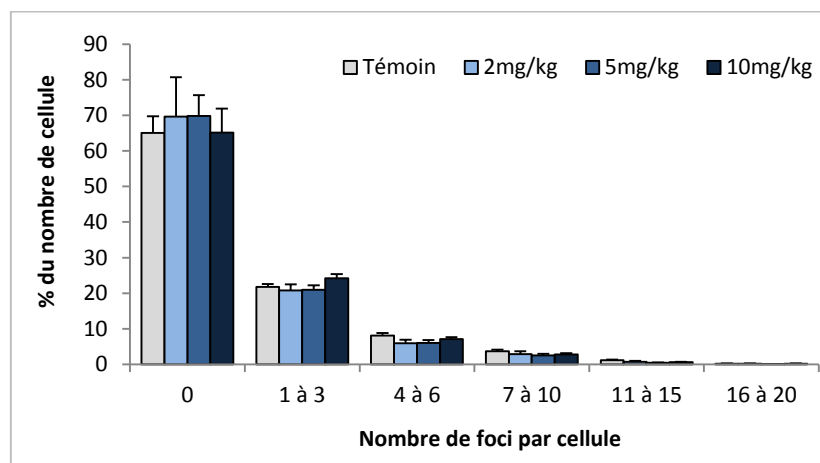
##### a. Contexte et protocole

Des tests d'immunomarquages de  $\gamma$ -H<sub>2</sub>AX ont également été effectués sur certaines de nos lames issues des traitements au fluor. Les animaux ont été traités avec différentes concentrations aiguës de fluor (0, 2, 5 et 10 mg/kg NaF), puis euthanasiés 72 heures après, tel que décrit dans la partie suivante. Dans le cadre de cette mise au point, les effectifs sont de 4 pour le groupe témoin et de 5 pour les groupes traités.





**Figure 40 : Dommages à l'ADN induits dans les cellules rénales de souris traitées au fluor**  
La répartition des animaux est la suivante : N=4 pour le groupe témoin et N=5 pour les groupes traités.



**Figure 41 : Répartition du nombre de foyers  $\gamma$ -H2AX dans le même modèle**  
La répartition des foyers  $\gamma$ -H<sub>2</sub>AX dans les noyaux des cellules rénales est exprimée en % du nombre de cellules étudiées en fonction du nombre de foci/cellules. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. La répartition des animaux est la suivante : N=4 pour le groupe témoin et N=5 pour les groupes traités.

**Tableau 12 : Score histopathologique de reins de souris 48 et 72 heures après injection IP d'uranium ou de fluor**

Groupe	URANIUM								FLUOR							
	48 heures				72 heures				48 heures				72 heures			
	0 mg/kg	2 mg/kg	4 mg/kg	5 mg/kg	0 mg/kg	2 mg/kg	4 mg/kg	5 mg/kg	0 mg/kg	2 mg/kg	5 mg/kg	10 mg/kg	0 mg/kg	2 mg/kg	5 mg/kg	10 mg/kg
Nombre d'animaux	5	5	6	6	5	6	6	6	5	5	6	5	4	6	6	6
Normal	5	5	2	1	5	4	0	0	5	5	6	0	4	6	6	0
Nécrose tubulaire (total)	(0)	(0)	(4)	(5)	(0)	(1)	(6)	(6)	(0)	(0)	(0)	(5)	(0)	(0)	(0)	(6)
Minimale	0	0	4	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	4
Légère	0	0	0	5	0	0	1	1	0	0	0	2	0	0	0	1
Modérée	0	0	0	0	0	0	4	4	0	0	0	2	0	0	0	1
Sévère	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Régénération tubulaire (total)	(0)	(0)	(0)	(2)	(0)	(0)	(5)	(6)	(0)	(0)	(0)	(4)	(0)	(0)	(0)	(4)
Minimale	0	0	0	2	0	0	2	1	0	0	0	3	0	0	0	3
Légère	0	0	0	0	0	0	2	4	0	0	0	1	0	0	0	0
Modérée	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1
Inflammation, cellules mononucléées (total)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(4)	(6)								
Minimale	0	0	0	0	0	1	3	5								
Légère	0	0	0	0	0	0	1	1								
Fibrose (total)	(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(1)	(4)	(3)								
Minimale	0	0	1	0	0	1	4	2								
Légère	0	0	0	0	0	0	0	1								

### b. Résultats

Le nombre moyen de foyers par noyau est présenté en **figure 40**. En analysant les groupes traités, il semblerait qu'il y ait une augmentation de phosphorylation de H<sub>2</sub>AX en fonction de la dose de fluor. Cependant, le taux élevé de foyers par noyau chez le groupe témoin ne permet pas de montrer une différence statistique en fonction de la dose.

Il existe plusieurs méthodes de quantification des CDB à travers la phosphorylation de l'histone H<sub>2</sub>AX, prenant en compte le nombre de foyers par noyau, leur taille ainsi que la distance qui les sépare, la répartition des noyaux en fonction du nombre de foyers qu'ils présentent, etc. Nous avons donc étudié la répartition du nombre de foyers par noyau dans les cellules rénales (**figure 41**), sans observer de différences intergroupe, ni même de tendance.

### 3. Conclusion

Les résultats obtenus ne nous ont pas permis de quantifier la phosphorylation de H<sub>2</sub>AX avec suffisamment de précision, et le taux de dommages quantifiés dans les groupes témoins ne correspondait pas aux taux décrits dans la littérature. Ce phénomène pourrait provenir d'un mauvais ajustement des paramètres de détection du logiciel Metafer-Metacyte. En tenant compte de l'aspect chronophage de cette étude et des mises au point nécessaires à faire avec le logiciel (qui ne peuvent être faites que par un professionnel qualifié connaissant le logiciel), ainsi qu'au niveau expérimental (analyse de témoins positifs, comptage manuel en comparaison, tests de répétabilité...), nous n'avons donc pas poursuivi l'étude de  $\gamma$ -H<sub>2</sub>AX sur ce modèle.

### C. Comparaison de la néphrotoxicité de l'uranium et du fluor 48h et 72h après traitement aigu

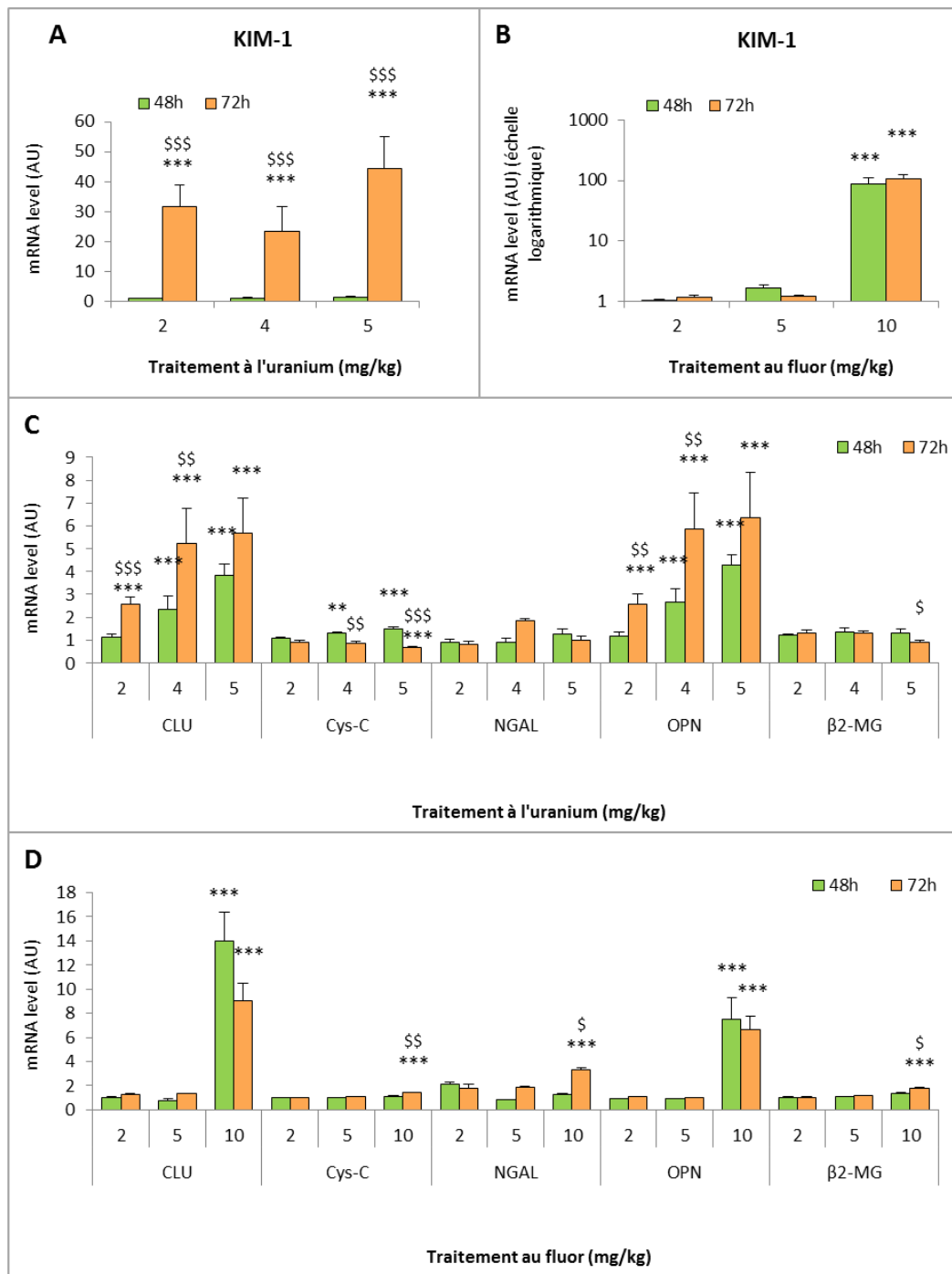
#### 1. Contexte et protocole

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, peu d'études existent sur la néphrotoxicité aiguë du fluor et sa biocinétique rénale alors que celle de l'uranium est bien décrite. Ainsi, de nombreuses études ont permis de déterminer un pic de néphrotoxicité de l'uranium situé entre 48 et 72 heures dans le cadre d'une exposition aiguë chez le rongeur.

Afin de pouvoir comparer la néphrotoxicité de l'uranium et du fluor et ainsi déterminer la dose challenge qui sera utilisée par la suite, nous avons testé deux temps d'euthanasie post injection : 48 et 72 heures et trois doses administrées par injection IP.

#### 2. Résultats

Dans un premier temps, des analyses histopathologiques ont été réalisées, et ont montré différents types de dommages structuraux dans le rein (nécrose tubulaire, régénération tubulaire, inflammation et fibrose). Après attribution d'un score d'atteinte, on constate que les dommages structuraux induits par le fluor ne sont visibles qu'à la dose de 10 mg/kg, sans différence significative entre les groupes euthanasiés après 48 et 72 heures. Sous cette dose ( $\leq 5$ mg/kg), aucune atteinte histopathologique significative n'a été mise en évidence (**tableau 12**). En revanche, les dommages



**Figure 42 : Expression génique de biomarqueurs de néphrotoxicité dans le rein de souris traitées à l'uranium ou au fluor 48 et 72 heures après injection IP**

Les souris ont été traitées intrapéritonéalement avec de l'uranium (0, 2, 4 et 5 mg/kg) ou du fluor (0, 2, 5 et 10 mg/kg de NaF). L'expression génique de KIM-1 est mesurée chez les souris traitées à l'uranium (A) et au fluor (B), de la même manière que les autres biomarqueurs d'atteinte rénales (C-D). Les résultats sont exprimés en tant que moyenne  $\pm$  SEM, avec  $n=6$  pour chaque groupe. Un test de Holm-Sidak a permis de faire les analyses statistiques, avec une différence significative entre les groupes traités et leur groupe témoin ( $*p<0.05$ ,  $**p<0.005$ ,  $***p<0.001$ ), et une différence significative entre les deux temps 48 et 72 heures ( $\$ p<0.05$ ,  $\$\$ p<0.005$ ,  $\$\$\$ p<0.001$ ).

induits par l'uranium sont visibles dès 2 mg/kg, avec un score significatif en comparaison avec le groupe témoin. Les scores d'atteinte indiqués dans le **tableau 12** montrent que l'atteinte histopathologique est plus importante à 72 heures après un traitement aigu à l'uranium.

Les résultats obtenus pour les groupes étudiés 72 heures après traitement aigu ont été plus détaillés dans l'article présenté ci-après, avec un score d'atteinte rénale ainsi qu'une répartition des lésions rénales induites par l'uranium et le fluor (Bontemps et al. 2019, figure 3).

Des analyses de marqueurs de néphrotoxicité au niveau génique ont également été effectuées, avec un panel : KIM-1, CLU, cys-C, NGAL, OPN et B2MG. Les résultats obtenus après un traitement aigu à l'uranium montrent que les marqueurs de la néphrotoxicité sont généralement plus induits à 72 heures qu'à 48 heures, et ce principalement dans le cas de KIM-1, CLU et OPN (**figure 42 A et C**). Ces résultats confirment les analyses histopathologiques qui indiquent que la néphrotoxicité de l'uranium est plus prononcée à 72 heures qu'à 48 heures.

Dans le cas d'un traitement aigu au fluor, l'expression génique de KIM-1 (**figure 42B**) confirme également les résultats histopathologiques à 10 mg/kg sans différence significative entre les deux temps étudiés (48 et 72 heures après traitement IP). De plus, l'expression de CLU, NGAL et cys-C s'accordent à montrer qu'un traitement de 10 mg/kg de NaF induirait bien une néphrotoxicité à partir de 48 heures (**figure 42D**).

### **3. Conclusion**

Grâce aux analyses histologiques et moléculaires, nous avons pu montrer que l'atteinte rénale était plus importante 72 heures après injection d'uranium, sous nos conditions. Bien que les analyses histopathologiques faites sur les reins de souris traitées au fluor ne nous aient pas permis de différencier l'atteinte rénale entre les deux temps, les expressions géniques de certains marqueurs de néphrotoxicité tels que NGAL, B2MG et cys-C laissent supposer une atteinte légèrement plus importante après 72 heures. Étant donné que les résultats obtenus sur le fluor n'ont montré aucun signe de néphrotoxicité à la dose de 5 mg/kg de NaF (et en dessous), nous avons décidé d'ajouter une dose intermédiaire de 7.5 mg/kg dans la suite de notre étude.

Suite aux résultats obtenus, et afin de comparer la néphrotoxicité aiguë de l'uranium et du fluor, la suite de l'étude est réalisée avec un temps de 72 heures post injection.

### **D. Comparaison des phénotypes et des mécanismes moléculaires induits par deux néphrotoxiques : le nitrate d'uranyle et le fluorure de sodium.**

Une fois nos conditions mises en place grâce à ces études expérimentales préliminaires, nous avons pu comparer les effets et les mécanismes de néphrotoxicité aiguë induits par l'uranium et le fluor. Les résultats ont été valorisés dans un article présenté ci-après, publié début 2019 dans le journal "International Journal of Environmental Research and Public Health".



**ARTICLE 3**

**IN VIVO COMPARISON OF THE PHENOTYPIC ASPECTS AND MOLECULAR  
MECHANISMS OF TWO NEPHROTOXIC AGENTS, SODIUM FLUORIDE AND  
URANYL NITRATE**

Alice Bontemps, Laurine Conquet, Christelle Elie, Victor Magneron, Céline  
Gloaguen, Dimitri Kereselidze, Karine Tack, Olivier C. Barbier, Yann Guéguen

International Journal of Environmental Research and Public Health (2019) 16(7): 1136





Article

# In Vivo Comparison of the Phenotypic Aspects and Molecular Mechanisms of Two Nephrotoxic Agents, Sodium Fluoride and Uranyl Nitrate

Alice Bontemps <sup>1</sup>, Laurine Conquet <sup>1</sup>, Christelle Elie <sup>1</sup>, Victor Magneron <sup>1</sup> , Céline Gloaguen <sup>1</sup>, Dimitri Kereselidze <sup>1</sup>, Karine Tack <sup>1</sup>, Olivier C. Barbier <sup>2</sup> and Yann Guéguen <sup>1,3,\*</sup>

<sup>1</sup> Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), PSE-SANTE/SESANE/LRTOX, 92262 Fontenay-aux-Roses, France ; alice.bontemps@irsn.fr (A.B.); laurine.conquet54@gmail.com (L.C.); christelle.elie@irsn.fr (C.E.); victor.magneron-manpower@irsn.fr (V.M.); celine.gloaguen@irsn.fr (C.G.); dimitri.kereselidze@irsn.fr (D.K.); Karine.TACK@asn.fr (K.T.)

<sup>2</sup> Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Departamento de Toxicología, Av. IPN No. 2508 Col., San Pedro Zacatenco, México City, CP 07360, Mexico; obarbier@cinvestav.mx

<sup>3</sup> Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), PSE-SANTE/SESANE/LRSI, 92262 Fontenay-aux-Roses, France

\* Correspondence: yann.gueguen@irsn.fr; Tel.: +33-158-359-978

Received: 20 February 2019; Accepted: 26 March 2019; Published: 29 March 2019



**Abstract:** Because of their nephrotoxicity and presence in the environment, uranium (U) and fluoride (F) represent risks to the global population. There is a general lack of knowledge regarding the mechanisms of U and F nephrotoxicity and the underlying molecular pathways. The present study aims to compare the threshold of the appearance of renal impairment and to study apoptosis and inflammation as mechanisms of nephrotoxicity. C57BL/6J male mice were intraperitoneally treated with a single dose of U (0, 2, 4 and 5 mg/kg) or F (0, 2, 5, 7.5 and 10 mg/kg) and euthanized 72 h after. Renal phenotypic characteristics and biological mechanisms were evaluated by urine biochemistry, gene/protein expression, enzyme activity, and (immuno)histological analyses. U and F exposures induced nephrotoxicity in a dose-dependent manner, and the highest concentrations induced severe histopathological alterations as well as increased gene expression and urinary excretion of nephrotoxicity biomarkers. KIM-1 gene expression was induced starting at 2 mg/kg U and 7.5 mg/kg F, and this increase in expression was confirmed through in situ detection of this biomarker of nephrotoxicity. Both treatments induced inflammation as evidenced by cell adhesion molecule expression and in situ levels, whereas caspase 3/7-dependent apoptosis was increased only after U treatment. Overall, a single dose of F or U induced histopathologic evidence of nephrotoxicity renal impairment and inflammation in mice with thresholds under 7.5 mg/kg and 4 mg/kg, respectively.

**Keywords:** uranium; fluoride; kidney; KIM-1; apoptosis; inflammation

## 1. Introduction

General populations can be exposed to both uranium (U) and fluoride (F) because of their natural and anthropogenic presence in the environment. Occupational and other activities lead to heterogeneous exposures to U from ore mining, milling and processing, whereas F exposure comes mainly from dental hygiene products, pesticides and water sources in some regions. These contaminants can be distributed throughout the body after ingestion, inhalation and transdermal



exposure and can alter several organs, including bone, lung, liver, brain, and kidney [1–4]. Among these organs, the kidney is the most sensitive to U and F [5–7].

Both U and F are known as nephrotoxicants at high doses, despite notable chemical differences which makes them interesting to compare. Since U is a radioelement emitting alpha particles and a heavy metal, it can induce radiotoxicity or chemical toxicity, depending on its isotopic composition (enrichment of the most radiotoxic  $U^{235}$ ) [4,6,8]. According to numerous oxidation states, the speciation of U is relatively complex. As a primarily cationic substance, U can form complexes with many anions. However, F only presents chemical toxicity and because of its high electronegativity, its anionic form usually binds with cationic species such as those in the calcium-rich areas of bone [9].

Because of its functions in filtration, transport and reabsorption, the kidney is a primary target organ of F and U toxicity; F and U exhibit renal accumulation, specifically in the cortical and juxtaglomerular areas where the proximal tubules are located [10–13]. Indeed, acute exposure to U induces nephrotoxicity in both humans and animals [6,14] and this impairment is mainly observed in proximal tubule renal epithelial cells [15,16]. After acute exposure of 1 to 5 mg/kg U injected intraperitoneally or intramuscularly, rodents demonstrated tubular necrosis and changes in blood chemistry reflecting severe renal alterations [16–18]. Similarly, intravenous acute exposures to F induce kidney damage in rats [19], even at low concentrations [20]. The intravenous administration of F in rats induced renal tissue injury in a dose-dependent manner and the toxic effects of F on the kidney were more pronounced in the proximal tubule than in the glomerular region [12,19].

Different mechanisms have been identified in F and U toxicity such as oxidative stress, autophagy, genotoxicity and apoptosis, using *in vitro* models [21–25]. These mechanisms also seem to be involved in F and U toxicity *in vivo* in addition to inflammation [26–32]. Interestingly, the two specific mechanisms of apoptosis and inflammation were implicated in kidney cell toxicity after both U and F exposures *in vitro* but needed to be demonstrated *in vivo*. Moreover, it would be interesting to understand whether the inflammatory response could be one of the first signs of U or F nephrotoxicity, subsequently leading to cell death through apoptosis. Therefore, our work aims to compare both U and F in a dose-response study to identify the threshold of the appearance of nephrotoxicity in mice and the underlying mechanisms involved, using functional, structural and mechanistic analysis at the gene, protein and *in situ* levels.

## 2. Materials and Methods

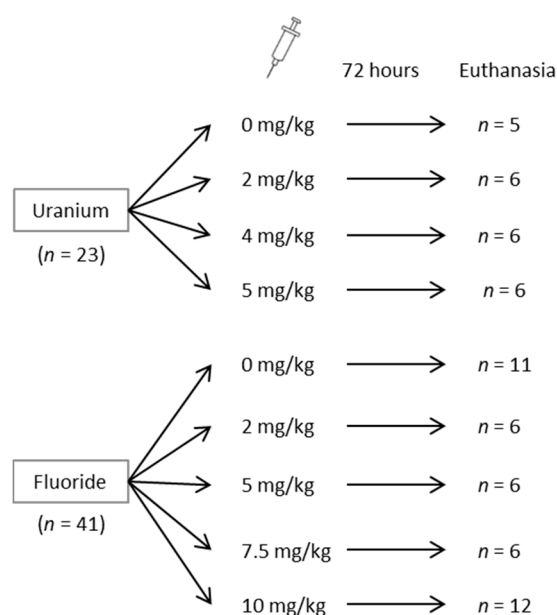
### 2.1. Animals

The study was performed with 8-week-old male C57BL/6J mice provided by Charles River (Saint Germain Nuelles, France), weighing  $25 \pm 5$  g. Animals were housed in groups of six under a 12 h/12 h light-dark cycle (light from 7 a.m. to 7 p.m.) with a constant temperature of  $21 \pm 1$  °C. One week of acclimatization was provided before the beginning of the study. Water and food were supplied *ad libitum*. Body weight gain was monitored twice per week, before and after a 24-h period in metabolic cages. The study was approved by the IRSN Animal Care Committee #81 and conducted in accordance with French legislation on the protection of animals used for experimental purposes (EC Directive 2010/63/EU and French Decret 2013–118). All experiments were approved by the Ethics Committee #81 and authorized by the French Ministry of Research under the reference APAFIS#9324-2017031613376362 v1 (internal project number P16-05), delivered on 4 July 2017.

### 2.2. Intraperitoneal Injection of Animals with U or F and Urine Collection

U was obtained as uranyl nitrate (UN) (Merck-Prolabo, Fontenay-sous-Bois, France), with a specific activity of  $14 \times 10^3$  Bq/g and composed of 99.74%  $^{238}\text{U}$ , 0.26%  $^{235}\text{U}$ , and 0.001%  $^{234}\text{U}$ . F was obtained as sodium fluoride (NaF) from Sigma (Saint-Quentin Fallavier, France). The ketamine (Imalgène 1000) and xylazine (5% Rompun) solutions were obtained from Centravet (Dinan, France).

Mice were divided into two groups as shown in Figure 1: the first group was treated with UN, whereas the second group was treated with NaF. On two occasions, the animals were housed individually in metabolic cages (Tecniplast, Decines Charpieu, France) for a 24-h period to collect urine samples: four days before and immediately after treatment. After collection, urine samples were subsequently centrifuged at 3000 g for 2 min at 4 °C, and the supernatants were isolated and stored at −80 °C. Mice were treated with an intraperitoneal injection with saline solution (NaCl) as a control, or treated with 2, 4 or 5 mg/kg UN ( $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2$ ) or 5.5, 11, 16.6 or 22.1 mg/kg NaF (corresponding to 2, 5, 7.5 and 10 mg/kg F). UN and NaF were diluted in a NaCl solution and filtered the day of the injection. Animals were then euthanized 72 h later. The choice of doses and time of exposure was based on literature and previous experiments of the authors showing a peak of renal effects at 72 h post-injection for U [14,16–20]. The experimental design and the animal distribution are presented in Figure 1.



**Figure 1.** General scheme for the distribution of mice in uranium and fluoride groups and the doses administered.

### 2.3. Euthanasia and Kidney Collection

Seventy-two hours after injection, the animals were anaesthetized by intraperitoneal injection of 100 mg/kg ketamine and 10 mg/kg xylazine and euthanized by exsanguination. Both kidneys were collected, weighed and sagittally cut. Half the right kidney was placed in 4% formaldehyde for histopathological analysis, and the other half was used for U or F quantification. The entire left kidney was designated for biomolecular analysis after being flash-frozen in liquid nitrogen and stored at −80 °C.

### 2.4. U and F Measurements in Urine and Kidney Tissue

U was quantified in urine and kidney by inductively-coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) (ICP-MS, PQ, Excell, Thermo Electron, Villebon-sur-Yvette, France). U was measured in urine after dilution. The half-kidney was digested in nitric acid and hydrogen peroxide, and the samples were then evaporated and dissolved in nitric acid. After the appropriate dilution, the U content was measured using bismuth as an internal control and a U calibration curve. The detection limit of U was determined by ICP-MS: 0.5 ng/L for  $^{238}\text{U}$  and 0.01 ng/L for  $^{235}\text{U}$ . F was quantified in urine and kidney by a potentiometric method using an ion selective electrode (Thermo Scientific Orion, Villebon-sur-Yvette, France). The urine samples were diluted before measurements, and the half-kidneys were transferred

into platinum crucibles and treated with a 5% magnesium acetate solution. As described by Inkielewicz in 2003, the specimens were pyrolyzed in an oven at 500 °C for 24 h, and the cooled samples were transferred into polyethylene measuring vessels by rinsing the crucibles with perchloric acid solution, a 1 molar solution of citrate and finally total ionic strength adjustment buffer at pH = 5.2 [33].

### 2.5. Urinary Biochemical Measurements

An automated Konelab 20 (Thermo Scientific) was used to assay the levels of creatinine, urea, total proteins, glucose, calcium (Ca), potassium (K), phosphorus (P) and sodium (Na) in urine. All the reagents came from Thermo Electron Corporation (Villebon-sur-Yvette, France).

### 2.6. Histopathology and Immunostaining

After 24 h in 4% formaldehyde, the preserved half-kidney was dehydrated before being embedded in paraffin and cut into 5 µm slices with a microtome. Hematoxylin, eosin, and saffron (HES) staining was conducted, and the slides were sent to an outside expertized laboratory of pathologists to perform the anatomopathological analyses (Biodoxis Laboratories, Romainville, France). Glomerular damage was defined by the presence of glomerulosclerosis and glomerular cystic dilatation, whereas tubular lesions were defined by the following: (1) necrosis; (2) regeneration and dilatation of the tubules; (3) interstitial inflammation; and (4) fibrosis. The different kinds of lesions were scored from 0 to 4 for each animal. The total sum of all lesions corresponded to the global scoring and the percentage of each lesion among the tubulointerstitial lesions was then calculated as previously described [34]. Paraffin-embedded slices were deparaffinized and hydrated in descending gradations of ethanol and in 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diluted in PBS to block endogenous peroxidase activity. For kidney injury molecule-1 (KIM-1) staining, antigen retrieval was achieved with citrate buffer at pH = 6. Sections were then incubated overnight with anti-KIM-1 (Abcam, Paris, France, ab47635) using a 200-fold dilution at 4 °C in a moist chamber. After washing, the slices were incubated with Alexa Fluor goat anti-rabbit secondary antibody (Abcam, ab150061). Finally, the nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole contained in Vectashield antifade mounting medium for fluorescence visualization. Ten photomicrographs per animal were collected with a LEICA DM 4000B fluorescence microscope, and semiquantification of fluorescent labeling was performed with Histolab Software (version 8.1.2, Microvision Instruments, Lisses, France). For intercellular adhesion molecule (ICAM) and vascular cell adhesion molecule (VCAM) staining, antigen retrieval was achieved with Tris/EDTA buffer at pH = 9. Sections were then incubated for 1 h with anti-ICAM-1 (Abcam, ab119871) diluted 250-fold or with anti-VCAM-1 (Abcam, ab134047) diluted 1000-fold at room temperature in a moist chamber. After washing, the slices were incubated with anti-rat and anti-rabbit secondary antibodies to be finally stained using a DAB revelation kit (MMFrance, Brignais, France). A counterstaining with hematoxylin was performed to identify renal structures. Ten photomicrographs per animal were collected with a DM 4000B microscope (LEICA, Paris, France) and semiquantification of stained area was performed using Histolab Software.

### 2.7. KIM-1 and CLU Detection in Urine

KIM-1 and clusterin (CLU) were measured in urine samples using ELISA kits and according to the manufacturer's instructions (R&D Systems, Lille, France). To comply with the concentration intervals of the assay, the urine samples were diluted 1:100 for the CLU assay and 1:10 to 1:100 for the KIM-1 assay.

### 2.8. Real-Time RT-PCR

Total RNA was extracted from the renal cortex by following the manufacturer's instructions (Total RNA isolation kit, Qiagen, Les Ulis, France) and was reverse-transcribed into cDNA with High-capacity cDNA reverse transcription kits (Fisher Scientific, Illkirch, France). Real-time polymerase chain reactions (RT-PCR) was made with a final concentration of 1 ng/µL cDNA for 10 µL per well,

containing 2.5% v/v primers (Fisher Scientific, Illkirch, France), 83% v/v SYBR (Fisher Scientific, Illkirch, France), and 14.5% v/v sterile water. Table 1 reports accession number, and primer sequences of each gene used in this study to analyze the mRNA levels of proteins involved in nephrotoxicity and inflammation: KIM-1, CLU, osteopontin (OPN), ICAM-1, and VCAM-1. The AbiPrism 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems, France) was used to detect real-time RT-PCR products. The comparative  $\Delta\Delta C_t$  method was used to determine relative quantification of each gene expression in comparison with the geometric average of the  $C_t$  values of housekeeping genes hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). Finally, the fold induction for each treated group was calculated relative to the control group (NaCl).

**Table 1.** Primer sequences of the genes analyzed with real-time RT-PCR.

Gene	Accession Number	Forward	Reverse
CLU	AF182509	TCGGGCATCTGGCATCA	AAGCTCACGGGCGAAGAAC
GAPDH	GU214026	TCCACTCACGGCAAATTC AACG	TAGACTCCACGACATACTCAGC
HPRT	NM_013556	TGCTGCGTCCCCAGACTTTTG	AGATAAGCGACAATCTACCAGAGG
ICAM-1	NM_010493	CACCCCAAGGACCCCAAGGAGAT	CGACGCCGCTCAGAAGAACCAC
KIM-1	BC053400	TTTCAGGCCTCATACTGCTTCTC	TGACCCACCACCCCTTT
OPN	AF515708	CCCTCGATGCATCCCTGTT	TTCCGTTGTTGTCCTGATCAGA
VCAM-1	BC029823	TCGGGTCTTGGGAGCCTCA	TGACCGTGACCGGCTTCCCA

### 2.9. Caspase 3/7 Activity

Pieces of the renal cortex (25 mg) were put into 1.5 mL Eppendorf tubes with 250  $\mu$ L hypotonic buffer containing 25 mM HEPES, 5 mM  $MgCl_2$ , 1 mM EDTA, 1 mM Pefabloc, 1  $\mu$ g/mL pepstatin, 1  $\mu$ g/mL leupeptin, and 1  $\mu$ g/mL trypsin inhibitor. Then, the pieces were ground with micropestles and centrifuged at 13,000 rpm for 15 min at 4 °C. The supernatants were collected and diluted 50-fold, and the protein concentrations of the supernatants were determined with a Bradford test. Then, sample was adjusted to 1 mg/mL before the determination of caspase activity with a detection kit (Promega, Charbonnières-les-Bains, France, G8091).

### 2.10. Statistical Analyses

Statistical analyses were performed using the SigmaPlot 11.0 software (Systat Software, Inc., Erkrath, Germany), except for the semiquantification of the immunostainings, for which Histolab Software was used as described previously (Microvision Instruments). A one-way analysis of variance (ANOVA) test was used to compare each group, and the Holm-Sidak method was applied for multiple comparisons. For the semiquantification of immunostainings, a general estimating equation (GEE) was performed using the R (version 3.4.4, R Core Team, Boston, MA, USA) and RStudio software packages (version 1.1.423, RStudio Inc., Boston, MA, USA). The level of significance was set at  $p < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Dose-Dependent Increase of F and U in Urine

The F and U contents in mouse urine samples were measured four days before treatment, and immediately after F and U treatments. Tables 2 and 3 show the F and U levels in urine, and the levels of both increase proportionally to the concentrations injected into animals.

The U content was also quantified in kidney tissue (data not shown) as previously described [11]. In the case of F, the measurements were below the detection limit of the potentiometer. This protocol is adapted from the method Inkielewicz-Stepniak used in rats [34] but the absence of levels above the detection limit is probably due to the small amount of renal tissue available in mice in contrast to rats. However, U showed a dose-dependent increase in the kidneys after treatment; the controls contained approximately 6 ng of U per gram of tissue, whereas the groups treated with 2, 4 or 5 mg/kg UN showed respectively 5, 14 and 30  $\mu$ g U per gram of tissue (data not shown).

**Table 2.** Fluoride content in urine samples before and directly after intraperitoneal injection.

Fluoride		Mean ± SEM
		µg/24 h
Before injection	Control	2.8 ± 0.4
	2 mg/kg	2.8 ± 0.4
	5 mg/kg	2.5 ± 0.3
	7.5 mg/kg	2.7 ± 0.3
	10 mg/kg	2.4 ± 0.2
After injection	Control	3.0 ± 0.5
	2 mg/kg	15.1 ± 1.2 *
	5 mg/kg	35.5 ± 3.2 ***
	7.5 mg/kg	43.0 ± 5.5 ***
	10 mg/kg	60.7 ± 5.4 ***

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.005$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , Holm-Sidak test between the treated and control groups. SEM: standard error of the mean.

**Table 3.** Uranium content in urine samples before and directly after intraperitoneal injection.

Uranyl Nitrate		Mean ± SEM
		ng/24 h
Before injection	Control	17 ± 7
	2 mg/kg	32 ± 8
	4 mg/kg	49 ± 21
	5 mg/kg	40 ± 14
	Control	22 ± 9
After injection	2 mg/kg	3 870 ± 497 *
	4 mg/kg	8 323 ± 2 009 ***
	5 mg/kg	8 599 ± 2 442 ***

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.005$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , Holm-Sidak test between the treated and control groups.

### 3.2. Traditional Nephrotoxicity Biomarkers

The diuresis of mice was monitored with metabolic cages before and after treatments (Figure 2). Before treatment, no difference in diuresis among the groups was observed, and animals produced  $1.0 \pm 0.1$  mL of urine in a 24-h period. The injections of 5, 7.5 and 10 mg/kg NaF induced the production of 1.3, 1.7 and 3.3 mL of urine, respectively, in mice, which were significantly different levels of urine production from that of the control. Additionally, the urine levels produced by the groups treated with 7.5 and 10 mg/kg NaF were significantly different ( $p < 0.001$ ), which demonstrates a dose-dependent response to NaF. UN did not show significant differences in urinary flow rate after the injections under our experimental conditions.

Kidney integrity was evaluated by the functional parameters as shown in Tables 4 and 5. The NaF treatment groups showed an increase in Na and K excretion at 10 mg/kg ( $p < 0.001$ ), suggesting damaged interstitial tissue and renal failure. Glycosuria increased significantly in NaF-injected mice compared to the control mice, which confirms damage to tubular structures. Before treatment, the glucose excreted in urine was approximately  $3 \mu\text{mol}/24 \text{ h}$ . Mice treated with 10 mg/kg NaF had a 52-fold increase in glycosuria after 24 h. Similarly, UN induced an increase in glycosuria after an injection of 5 mg/kg ( $p < 0.001$ ), but it also induced calciuria starting at 2 mg/kg in the same proportion for all UN treatments ( $p < 0.05$ ).

**Table 4.** Urinary biochemical parameters of mice injected with fluoride.

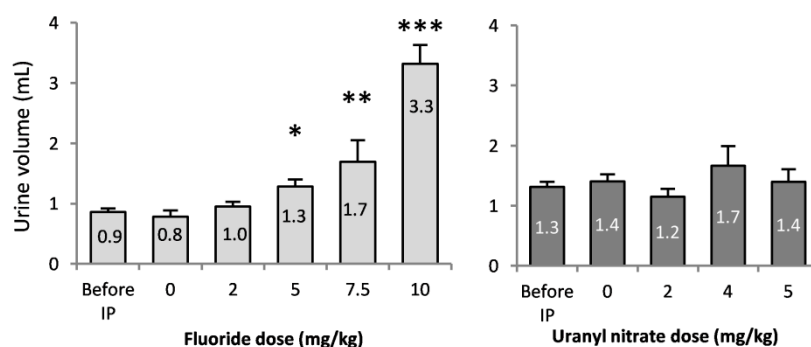
Fluoride		Creatinine	Glucose	Potassium	Sodium	Phosphorus	Total Protein	Urea	Calcium
		μmol/24 h	μmol/24 h	mmol/24 h	mmol/24 h	mmol/24 h	mg/24 h	mmol/24 h	μmol/24 h
Before injection	Control	4.07 ± 0.60	2.94 ± 0.45	0.14 ± 0.01	0.13 ± 0.02	0.14 ± 0.03	9.03 ± 1.86	1.67 ± 0.23	4.02 ± 0.66
	2 mg/kg	4.31 ± 0.28	4.98 ± 0.30	0.15 ± 0.01	0.13 ± 0.02	0.11 ± 0.03	8.15 ± 4.03	2.26 ± 0.32	4.74 ± 0.89
	5 mg/kg	4.12 ± 0.27	4.32 ± 0.35	0.14 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.12 ± 0.01	14.73 ± 3.47	2.20 ± 0.19	3.22 ± 0.28
	7.5 mg/kg	3.82 ± 0.44	3.03 ± 0.05	0.15 ± 0.05	0.16 ± 0.01	0.15 ± 0.00	7.80 ± 0.28	1.39 ± 0.27	4.88 ± 0.56
	10 mg/kg	3.53 ± 0.52	3.29 ± 0.56	0.13 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.14 ± 0.02	8.50 ± 1.83	1.61 ± 0.26	5.04 ± 1.32
After injection	Control	3.61 ± 0.51	3.41 ± 0.58	0.13 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.13 ± 0.01	9.15 ± 2.47	1.93 ± 0.39	2.58 ± 0.41
	2 mg/kg	4.19 ± 0.38	4.32 ± 0.86	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.01	10.66 ± 3.54	2.06 ± 0.39	3.57 ± 0.84
	5 mg/kg	4.56 ± 0.25	4.43 ± 0.43	0.15 ± 0.01	0.15 ± 0.02	0.13 ± 0.01	17.89 ± 2.30	2.55 ± 0.23	3.16 ± 0.35
	7.5 mg/kg	2.11 ± 0.49	17.52 ± 10.50	0.09 ± 0.02	0.13 ± 0.03	0.11 ± 0.02	3.82 ± 0.71	0.91 ± 0.21	2.79 ± 1.25
	10 mg/kg	4.72 ± 0.59	157.4 ± 46.08 ***	0.23 ± 0.03 ***	0.47 ± 0.09 ***	0.15 ± 0.02	16.88 ± 3.76	1.24 ± 0.17	3.89 ± 0.69

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.005$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , Holm-Sidak test between the treated and control groups.

**Table 5.** Urinary biochemical parameters of mice injected with uranium.

Uranyl Nitrate		Creatinine	Glucose	Potassium	Sodium	Phosphorus	Total Protein	Urea	Calcium
		μmol/24 h	μmol/24 h	mmol/24 h	mmol/24 h	mmol/24 h	mg/24 h	mmol/24 h	μmol/24 h
Before injection	Control	2.88 ± 0.52	4.31 ± 0.37	0.14 ± 0.01	0.21 ± 0.05	0.20 ± 0.02	10.05 ± 2.75	1.76 ± 0.27	4.03 ± 0.63
	2 mg/kg	3.11 ± 0.52	4.59 ± 0.39	0.14 ± 0.01	0.20 ± 0.02	0.16 ± 0.01	15.90 ± 3.36	1.48 ± 0.22	3.78 ± 0.25
	4 mg/kg	2.66 ± 0.50	3.88 ± 0.44	0.14 ± 0.01	0.23 ± 0.02	0.18 ± 0.02	10.67 ± 2.11	1.45 ± 0.24	4.13 ± 0.63
	5 mg/kg	3.35 ± 0.43	3.51 ± 0.59	0.15 ± 0.01	0.24 ± 0.03	0.18 ± 0.02	16.65 ± 2.73	1.80 ± 0.28	4.16 ± 0.47
After injection	Control	3.09 ± 0.55	4.50 ± 0.34	0.15 ± 0.01	0.21 ± 0.03	0.22 ± 0.01	16.33 ± 3.84	1.70 ± 0.29	3.71 ± 0.42
	2 mg/kg	2.99 ± 0.38	3.22 ± 0.19	0.13 ± 0.01	0.23 ± 0.02	0.17 ± 0.01	12.20 ± 2.00	1.37 ± 0.22	5.70 ± 0.65 *
	4 mg/kg	3.44 ± 0.35	7.06 ± 2.72	0.14 ± 0.02	0.29 ± 0.07	0.16 ± 0.02	11.31 ± 2.36	1.27 ± 0.29	6.82 ± 1.31 *
	5 mg/kg	3.61 ± 0.25	15.76 ± 3.71 ***	0.14 ± 0.01	0.28 ± 0.08	0.18 ± 0.01	19.36 ± 2.90	1.52 ± 0.21	6.23 ± 0.74 *

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.005$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , Holm-Sidak test between the treated and control groups.



**Figure 2.** 24-h urine volume collected before and immediately after the intraperitoneal injection of 0, 2, 5, 7.5 and 10 mg/kg F or 0, 2, 4 and 5 mg/kg UN. The results are presented as the mean  $\pm$  standard error of the mean. The asterisk represents a significant difference between the treated ( $n = 6$  to 12) and control ( $n = 10$ ) groups (Holm-Sidak test, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.005$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ).

Taken together, these data show that NaF injections induce diuresis, increased Na and K urinary levels, and glycosuria in a dose-dependent manner. These late nephrotoxicity markers suggest an established nephrotoxicity at 10 mg/kg NaF, whereas UN injections induce the urinary excretion of Ca starting at 2 mg/kg and glycosuria only at 5 mg/kg, without the induction of diuresis. These results do not allow us to conclude the nephrotoxicity of UN under our conditions with the selected biomarkers.

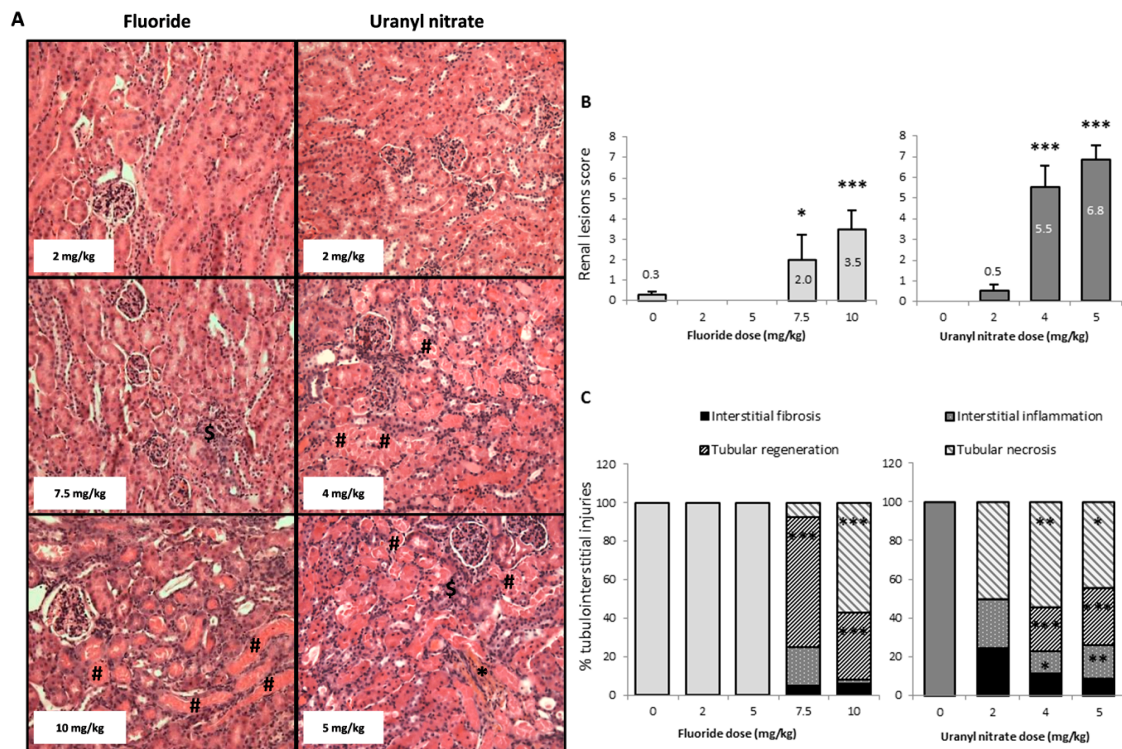
### 3.3. Both U and F Induce Structural Lesions in the Kidney

Figure 3A shows representative photomicrographs of mouse kidneys 72 h after injection. This panel shows groups of mice treated with NaF (2, 7.5, and 10 mg/kg) and UN (2, 4 and 5 mg/kg). A score was established based on the microscopic evaluation of the kidney (Figure 3B) to scale the structural damage from nonexistent to severe levels. In addition, the extent of tubular necrosis, tubular regeneration, interstitial inflammation, and interstitial fibrosis was quantified for each experimental group (Figure 3C).

NaF treatment at 7.5 and 10 mg/kg induced global kidney lesions that were scored as 2 (mild damage) and 3.5 (moderate damage), respectively. However, 4 and 5 mg/kg UN induced scores of 5.5 and 6.8, respectively, corresponding to severe damage (Figure 3B). The NaF injections induced structural damage with tubular necrosis and tissue regeneration at a concentration of 7.5 mg/kg, but no damage was induced at 2 and 5 mg/kg. Moreover, UN induced significant structural damage beginning at 4 mg/kg with tubular necrosis and regeneration in addition to interstitial inflammation.

The histograms shown in Figure 3C represent the extent of the different mechanisms responsible for the tubulo-interstitial injuries in different groups of mice. Thus, 68 and 35% of the tubules presented tubular regeneration 72 h after NaF injections at doses of 7.5 and 10 mg/kg, respectively, and 57% of the tubules showed necrosis after a 10 mg/kg injection. In the UN-treated animals, 2 mg/kg did not induce any apparent tubulo-interstitial injury, whereas 4 and 5 mg/kg induced similar damage to NaF, with approximately 50% tubular necrosis and 26% tubular regeneration. The UN treatments of 4 and 5 mg/kg also induced significant 12 and 18% increases in inflammation respectively (Figure 3C).

Overall, we can observe distinct histological alterations induced by F and U. On the one hand, an increase in NaF concentrations induces increasing damages in the renal cortex, with the appearance of necrosis at 10 mg/kg, whereas at 7.5 mg/kg we can detect tubular regeneration, a compensation mechanism testifying of an early appearing nephrotoxicity. On the other hand, UN directly induced tubular regeneration and necrosis starting at 4 mg/kg, suggesting that the compensatory mechanism of tubular regeneration may be significantly induced between 2 and 4 mg/kg, before the appearance of irreversible damage.

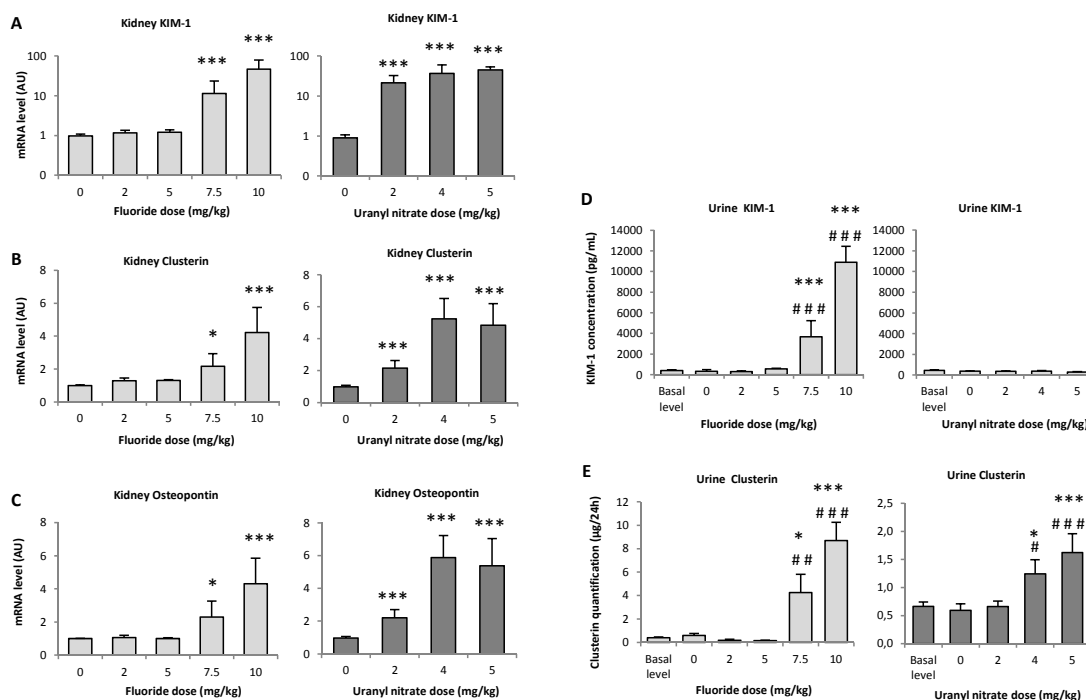


**Figure 3.** (A) Representative photomicrographs (200×) of renal lesions after HES staining in mice 72 h following the intraperitoneal injection of 2, 7.5 and 10 mg/kg F or 2, 4 and 5 mg/kg UN. The sharp symbol (#) indicates mild coagulative necrosis of the tubular epithelium. Affected tubule lumens are filled with hypereosinophilic granular debris. The dollar symbol (\$) indicates tubular regeneration with basophilic tubules. The asterisk (\*) shows interstitial fibrosis and inflammation, as revealed by saffron coloration. (B) The renal lesion scores and (C) the percentage of tubular and interstitial injuries (tubular necrosis, basophilic tubules, interstitial inflammation and interstitial fibrosis) in kidneys 72 h after the intraperitoneal injection of 0, 2, 5, 7.5 and 10 mg/kg F or 0, 2, 4 and 5 mg/kg UN. The results are presented as the mean  $\pm$  standard error of the mean. The asterisk represents a significant difference between the treated ( $n = 6$  to 12) and control ( $n = 11$ ) groups (Holm-Sidak test, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.005$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ).

#### 3.4. Biomarkers of Early Kidney Injury Increase after F and U Treatments

KIM-1 is a protein that is overexpressed in the early stages of kidney damage. In the renal tissue of animals treated with 7.5 and 10 mg/kg NaF, KIM-1 gene expression was enhanced by 11- and 47-fold, respectively, compared to the control ( $p < 0.001$ ); however, 2, 4 and 5 mg/kg UN induced 21-, 36- and 44-fold increases in KIM-1 gene expression, respectively ( $p < 0.001$ ) (Figure 4A). As expected, KIM-1 gene expression seems to increase with increasing doses of both treatments: 10 mg/kg NaF induced increased KIM-1 expression compared to 7.5 mg/kg NaF ( $p < 0.05$ ), while UN increased KIM-1 expression at the concentrations between 4 and 5 mg/kg ( $p < 0.05$ ).





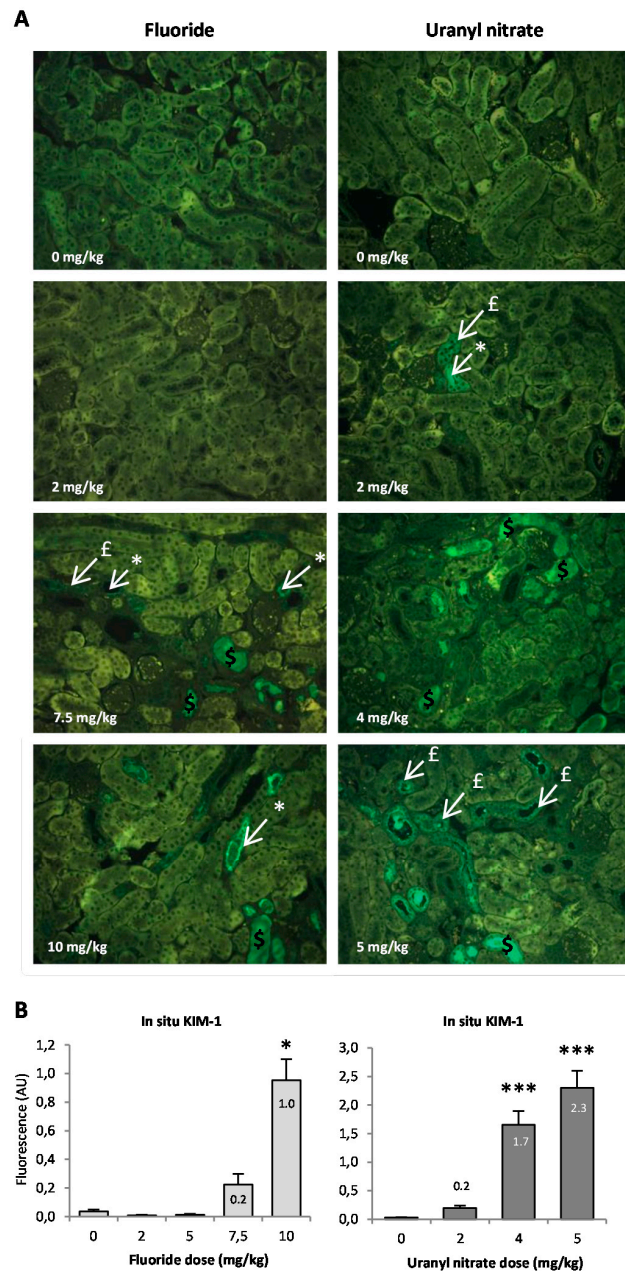
Treatment Measured parameters	FLUORIDE DOSE (mg/kg)					URANYL NITRATE DOSE (mg/kg)			
	0	2	5	7.5	10	0	2	4	5
Kidney KIM-1	1.0	1.2	1.2	11.4	46.9	1.0	21.2	36.3	44.5
Kidney CLU	1.0	1.3	1.3	2.2	4.2	1.0	2.2	5.2	4.9
Kidney OPN	1.0	1.1	1.0	2.3	4.3	1.0	2.2	5.9	5.4
Urine KIM-1	329	289	574	3 667	10 888	377	364	371	274
Urine CLU	0.6	0.2	0.2	4.3	8.7	0.6	0.7	1.3	1.6

**Figure 4.** (A–C) Gene expression of sensitive nephrotoxicity markers in the renal cortex 72 h after the intraperitoneal injection of 0, 2, 5, 7.5 and 10 mg/kg F or 0, 2, 4 and 5 mg/kg UN and (D,E) urinary protein levels of KIM-1 and clusterin in F- or U-injected mice. (F) The measured parameter values are reported in a table with the corresponding units given in each graph. The results of mRNA are expressed as a ratio to the mRNA levels of the housekeeping genes glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT). The results of (A) KIM-1 gene expression are presented on a logarithmic scale. All results are presented as the mean ± standard error of the mean. The asterisk represents a significant difference between the treated ( $n = 6$ ) and control ( $n = 5$ ) groups (Holm-Sidak test, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.005$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ). The sharp symbol represents a significant difference between the treated ( $n = 6$ ) and preinjected ( $n = 41$  to 47) mice (Holm-Sidak test, #  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.005$ , ###  $p < 0.001$ ).

The gene overexpression of KIM-1 in tissues was confirmed by the secretion of KIM-1 in urine samples after NaF treatment, whereas KIM-1 secretion was not increased in urine samples after UN treatment (Figure 4D). Specifically, in the case of NaF, the urinary levels of KIM-1 significantly increased in dose-dependent manner:  $p < 0.001$  for 7.5 vs. 5 mg/kg and  $p < 0.05$  for 7.5 vs. 10 mg/kg.

The in situ detection of KIM-1 in kidney slides is shown in Figure 5A; we can identify KIM-1 expression in the apical pole of tubular cells, distinguish the site of the synthesis of the protein (indicated by white arrows) from its expression in the whole tubular cells (indicated by red arrows) and visualize KIM-1 expression in the lumen after secretion (indicated by orange arrows). Using the photomicrographs, we observed that KIM-1 is absent from the lumen 72 h after a 2 mg/kg UN injection, whereas KIM-1 expression in the lumen is noticeable starting at 7.5 mg/kg NaF and 4 mg/kg UN. KIM-1 in situ expression was quantified (Figure 5B), and under our experimental

conditions, the protein appeared to be significantly upregulated starting at 10 mg/kg NaF ( $p < 0.05$ ) and 4 mg/kg UN ( $p < 0.001$ ). The highest concentrations of NaF and UN treatments induced 23.8- and 76.7-fold increases in KIM-1, respectively, compared to their control groups. These results, in addition to the gene expression and urinary secretion of the protein, indicate that KIM-1 increases in proportion to NaF treatment starting at 7.5 mg/kg, whereas UN does not seem to induce KIM-1 secretion in urine but does induce its gene and in situ expression in the kidney.



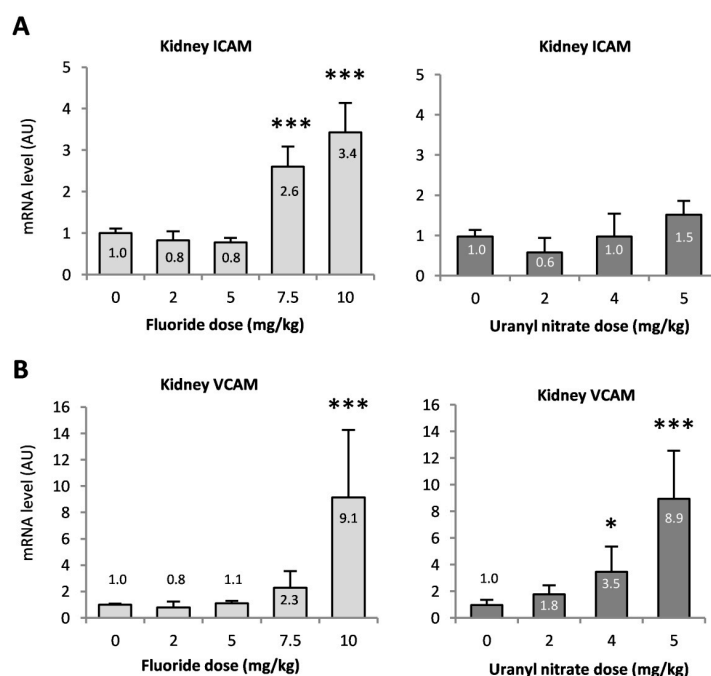
**Figure 5.** (A) Representative photomicrographs (200 $\times$ ) of KIM-1 in situ expression in the kidney of mice injected with F (0, 2, 5, 7.5 and 10 mg/kg) or U (0, 2, 4 and 5 mg/kg). The dollar symbol (\$) indicates the expression of KIM-1 in the lumen of proximal tubules. The sharp symbol (#) indicates KIM-1 expression in tubular cells. The asterisk indicates KIM-1 expression in the apical pole of tubular cells. (B) The results of the semi-quantification of KIM-1 in situ expression are presented as the mean  $\pm$  standard error of the mean. The asterisk represents a significant difference between the treated ( $n = 6$ ) and control ( $n = 5$ ) groups (general estimating equation, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.005$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ).

Similarly, OPN and CLU, proteins considered early biomarkers for a wide variety of acute or chronic renal impairments, were analyzed. In kidney extracts, OPN gene expression was increased by 2.3- and 4.3-fold after the 7.5 ( $p < 0.05$ ) and 10 mg/kg ( $p < 0.001$ ) NaF injections, respectively, whereas OPN was increased by 2.2-fold after a 2 mg/kg UN injection and by 5.5-fold after exposure to 4 or 5 mg/kg UN ( $p < 0.001$ ) (Figure 4C). CLU gene expression increased to a similar extent after NaF and UN injections in mice (Figure 4B), and the protein level was increased by 2.4- and 4.4-fold in urine samples after 7.5 ( $p < 0.05$ ) and 10 mg/kg ( $p < 0.001$ ) NaF injections, respectively. However, 4 and 5 mg/kg UN induced 2.2-fold ( $p < 0.05$ ) and 2.7-fold ( $p < 0.001$ ) increases in the CLU in urines, respectively (Figure 4E). Similar to KIM-1, CLU secretion in urine was lower in UN-treated mice than in NaF-treated mice when comparing the initial gene expression in kidney.

Overall, it seems that the gene expression of the nephrotoxicity biomarkers CLU and OPN and the secretion of CLU in urine samples reached a plateau starting at the 4 mg/kg UN injections, whereas NaF treatments showed an increase between 7.5 and 10 mg/kg for all biomarkers (genes, protein secretion and in situ levels). According to our results, the threshold of appearance of these nephrotoxicity biomarkers must be between 5 and 7.5 mg/kg NaF and between 2 and 4 mg/kg UN as determined by protein levels in urines and in situ.

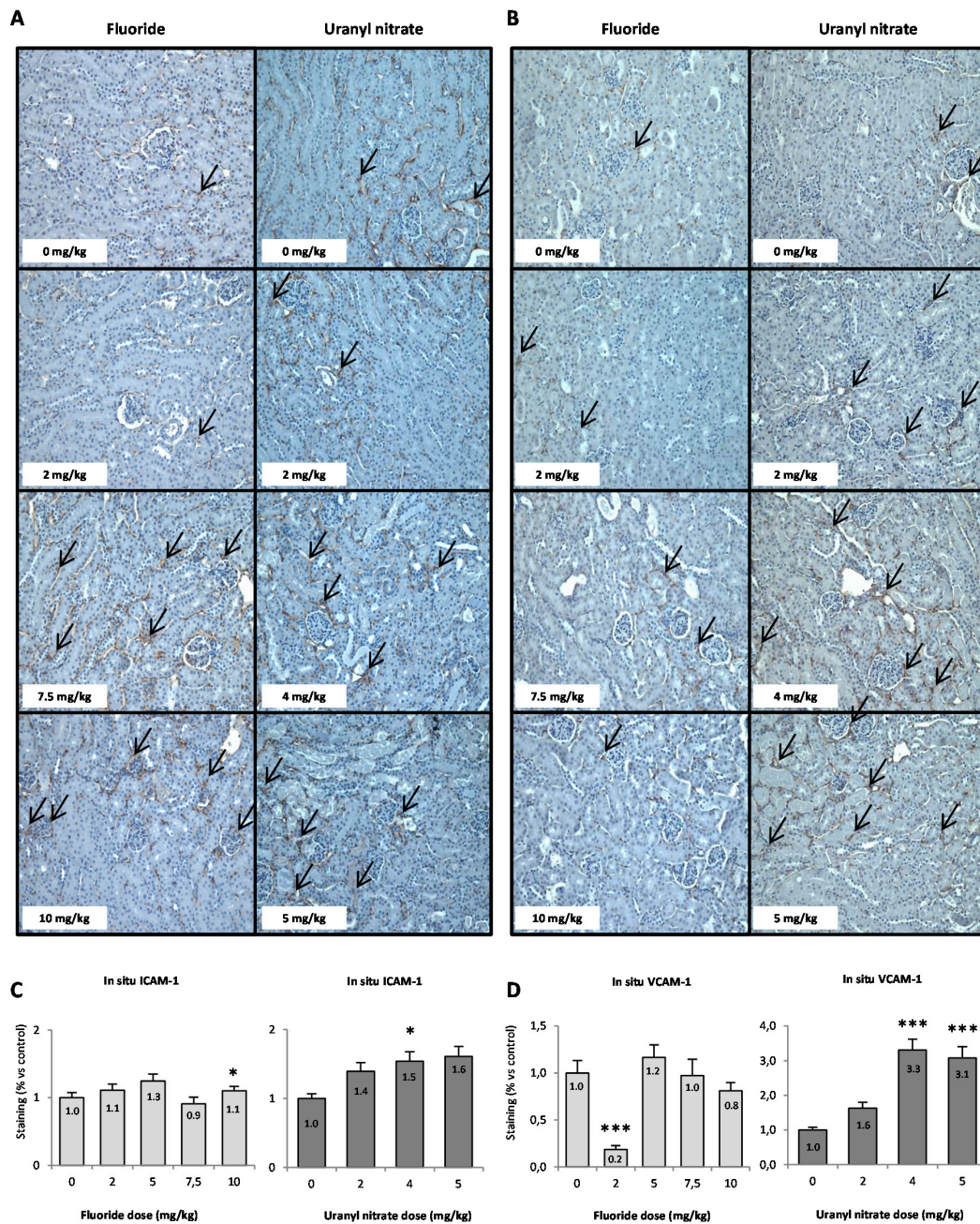
### 3.5. ICAM and VCAM Increase with F and U Treatments

ICAM-1 and VCAM-1 are two adhesion molecules involved in the recruitment of inflammatory cells. ICAM gene expression was mostly enhanced after NaF exposure, with 2.6- and 3.4-fold increases after the 7.5 and 10 mg/kg injections, respectively ( $p < 0.001$ ). The expression of the VCAM gene was also increased by 2.3- and 9.1-fold at 7.5 and 10 mg/kg NaF ( $p < 0.001$  at 10 mg/kg), respectively, whereas UN treatment increased VCAM gene expression by 3.5- and 9-fold after 4 ( $p < 0.05$ ) and 5 mg/kg ( $p < 0.001$ ) UN injections compared to the control, respectively (Figure 6).



**Figure 6.** Gene expression of the inflammatory markers (A) ICAM and (B) VCAM in the renal cortex 72 h after intraperitoneal injection of 0, 2, 5, 7.5 and 10 mg/kg F or 0, 2, 4 and 5 mg/kg UN in mice. The mRNA results are expressed as a ratio to the mRNA levels of the housekeeping genes glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT). The results are presented as the mean  $\pm$  standard error of the mean. The asterisk represents a significant difference between the treated ( $n = 6$ ) and control ( $n = 5$ ) groups (Holm-Sidak test, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.005$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ).

The in situ presence of ICAM and VCAM proteins is shown in Figure 7A,B, and the semi-quantifications of their level in the renal cortex are evaluated in Figure 7C,D. The semi-quantification of VCAM (Figure 7D) shows that exposure to 2 mg/kg NaF induced a downregulation of VCAM, suggesting a possible anti-inflammatory effect at low doses of NaF. There was no significant increase in ICAM and VCAM regulation in situ after acute treatment with NaF, but UN did induce VCAM upregulation starting at 4 mg/kg ( $p < 0.001$ ).

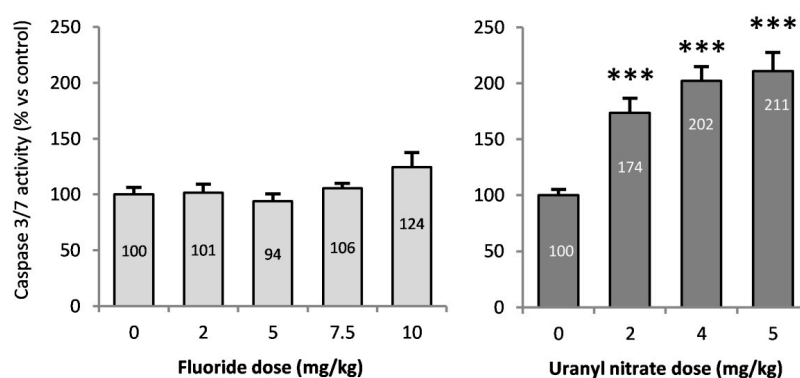


**Figure 7.** (A) Representative photomicrographs (200×) of ICAM (A) and VCAM (B) in situ expression in the kidneys of mice injected with F (0, 2, 5, 7.5 and 10 mg/kg) or UN (0, 2, 4 and 5 mg/kg). Black arrows indicate the presence of CAM proteins in the renal cortex. The results of the semi-quantification analyses of (C) ICAM and (D) VCAM in situ expressions are presented as the mean ± standard error of the mean. The asterisk represents a significant difference between the treated ( $n = 6$ ) and control ( $n = 5$ ) groups (general estimating equation, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.005$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ).

These results show that the in situ levels of ICAM and VCAM confirm the gene expression levels observed after UN treatment, whereas the increase in gene expression after NaF treatment was not observed under our conditions. In the case of UN, the results shown in Figures 6 and 7D suggest the involvement of the molecule VCAM in the recruitment of pro-inflammatory cells and could allow us to identify inflammation as a possible mechanism of U nephrotoxicity.

### 3.6. Caspase 3/7 Activities in the Kidneys of Mice Treated with F or U

Caspases 3 and 7 are effector proteins of apoptosis, and an increase in their activities implies the induction of this mechanism of death. Caspase 3/7 activity was evaluated in the renal cortex (Figure 8) and exhibited a significant increase beginning at 2 mg/kg UN ( $p < 0.001$ ), with a 210% increase after a 5 mg/kg injection (compared to control), whereas NaF did not significantly induce apoptosis. Caspase-dependent apoptosis seems to be induced starting at 2 mg/kg UN without any difference between treatment doses.



**Figure 8.** Caspase 3/7 activity in the renal cortex of mice 72 h after intraperitoneal injection of 0, 2, 5, 7.5 and 10 mg/kg F or 0, 2, 4 and 5 mg/kg UN. The results are presented as the mean  $\pm$  standard error of the mean. The asterisk represents a significant difference between the treated ( $n = 6$ ) and control ( $n = 5$ ) groups (Holm-Sidak test, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.005$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ).

## 4. Discussion

The kidney is a common target of U and F toxicity, and the comparison of their in vivo biological effects would help to elucidate their nephrotoxic molecular mechanisms. The goal of this study was to determine the threshold of nephrotoxicity using biomarkers sensitive to changes specifically in the kidney and to determine the role of inflammation and apoptosis in the renal effects of F- or U-induced nephrotoxicity in mice. Thus, groups of mice were treated with either NaF or UN at a range of toxic and nontoxic doses derived from the literature. Renal biological effects were analyzed 72 h later, a time previously described as the delay of appearance of the peak of nephrotoxicity [18]. The urinary concentrations of F and U were comparable to the urinary concentration of F after 40 days of exposure to 15–50 mg/L NaF through drinking water in rats [35] or the renal tissue content of U in rats treated with similar levels of U (2–5 mg/kg) [36]. Regardless of the dose used in our study, neither NaF nor UN induced weight loss, but starting at a dose of 5 mg/kg, NaF induced diuresis in a dose-dependent manner (Figure 2), as previously described [20]. NaF and UN also induced significant glycosuria, suggesting damage to tubular integrity. These changes in traditional parameters of nephrotoxicity suggest moderate or severe kidney damage induced by UN or NaF treatment starting at 5 and 10 mg/kg, respectively. The renal histopathology study confirmed that the NaF and UN treatments induce a significant increase in tubular damage and allowed us to determine a threshold of appearance for each kind of renal injury. Interestingly, the highest concentrations of NaF and UN induced approximately the same level of necrosis in the tubulointerstitial area and tubular regeneration (Figure 3). These results are in accordance with previous studies showing the induction of necrosis after acute treatments of F or U in other in vivo models [17,37]. Inflammation,

necrosis and regenerative processes were detected and quantified by histopathological scores. These types of lesions were also found in previous studies [18,38–41] and sometimes with glomerular damage too [17,42]; however, no structural lesions were previously observed in the kidney after acute F treatment [43]. Under our experimental conditions, the tubular regeneration with epithelial proliferation and tubular vacuolization and distortion induced in mice treated with 7.5 mg/kg NaF showed that kidney injuries may be reversible at this level, whereas the necrosis at 10 mg/kg suggests irreversible kidney impairment [44,45]. Indeed, previous studies showed a link between tubular regeneration and kidney recovery after gentamicin treatment [46] or 28 days after an injection of 4 mg/kg UN in mice showing partial recovery [18]. Accordingly, a proteomic analysis showed that tubular regeneration also occurred in chronic fluorosis in rats exposed to 221 mg/L NaF for 8 weeks, with the overexpression of proliferation-related proteins in renal tissue [47].

To more precisely evaluate the kidney injuries induced by the NaF and UN treatments, early biomarkers of kidney disease were measured in situ (Figure 5) and by analyzing gene expression (Figure 4). KIM-1 is a type 1 transmembrane protein whose expression is markedly upregulated in proximal tubule injuries [35,48,49]. In our experimental models, KIM-1 gene expression in the kidney significantly increased beginning at 7.5 mg/kg NaF and 2 mg/kg UN, respectively. For NaF, a similar sensitivity was obtained when the histopathology parameters were evaluated. For UN, the lesion score was not significant at 2 mg/kg; thus, a better threshold of nephrotoxicity was detected using the sensitive biomarker KIM-1 than that obtained using histopathology. The in situ expression level of KIM-1 confirmed a tubular injury starting at 7.5 mg/kg NaF and 2 mg/kg UN and revealed different stages of tubular alteration. Indeed, KIM-1 is a transmembrane protein that is mainly expressed in the apical pole of epithelial cells starting from minimal or mild tubular injury. Its expression throughout tubular epithelial cells and its excretion in the lumen of tubules are correlated with an increase in renal impairment [48,50]. To our knowledge, only two recent papers have studied the induction of KIM-1 in situ after U exposure in male Sprague-Dawley rats, and they showed an increase in KIM-1 in situ levels 48 h after an injection of 4 mg/kg UA [51]. Considering F exposure, if KIM-1 expression has been examined after experimental subchronic exposure to F, it was not previously studied after acute exposure in vivo. In contrast, chronic exposure to UN showed no increase in KIM-1 compared to the control group, even at the concentration of 600 mg/L [11,34] whereas F did after 50 mg/L contamination in drinking water [35].

The overexpression of OPN, a marker of both proximal and distal tubule injury, is also induced after treatments with UN and NaF. However, the extent of the effect and sensitivity of this assay was lower than the KIM-1 analyses. In comparison, subchronic exposure to 50 mg/L F did not induce a significant increase in OPN expression [35], whereas acute exposure to 5 mg/kg UA induced a 2.5-fold increase in its gene expression 72 h after intravenous injection [52]. CLU is a tubular damage marker, and it was overexpressed in the kidney under our experimental conditions. Interestingly, even if CLU gene expression was similarly induced after high treatments of NaF or UN (approximately 4.5-fold increase), the CLU urinary levels were not with the same order of magnitude for NaF (8.7-fold increase) and UN (1.6-fold increase). Similarly, KIM-1 was not induced in the same order of magnitude in the kidney and urine samples after UN treatment, unlike NaF. Yet, previous studies have shown that a good correlation between KIM-1 or CLU mRNA levels in the kidneys and urinary levels existed [34,53,54]. The differences observed in our conditions between the kidney and urinary levels are very likely due to the differences of timing of analysis. Indeed, the urine samples were collected directly after treatment, whereas the kidneys were removed 72 h after treatment. Interestingly, this difference of timing does not seem to have an impact on F nephrotoxicity evaluation, whereas it does impact the U analysis. These results could indicate a difference between the progressions of the U- and F-induced renal injury: U would have a slower mechanism of nephrotoxicity which is not identified on a 24-h period post treatment whereas F would have an immediate acute nephrotoxicity after the exposure. However, our data allow us to conclude that KIM-1 is a more sensitive biomarker than OPN and CLU for F and U nephrotoxicity detection. The histopathological study and the scoring suggested that NaF

induced less injury than UN, but the molecular study demonstrated that more specific biomarkers, such as KIM-1, allow us to precisely quantify the renal damage induced by UN or NaF on proximal tubular epithelial cells.

In addition, KIM-1 may play a role in the regulation of the molecular mechanisms of nephrotoxicity. In fact, the involvement of KIM-1 in the phagocytosis of dead cells from the tubular lumen has been identified [55,56]. Participating in the clearance of apoptotic debris of the tubular lumen, KIM-1 confers protection to the kidney after an acute tubular injury. Under our conditions, UN induced apoptosis after a 72-h period but not after 48 h (data not shown); thus we hypothesize that KIM-1 participates in the protection of the kidney during the acute nephrotoxicity induced by UN after a longer recovery period. F-induced apoptosis was observed after acute exposure in different models, but not in the kidney [29–31]. In vitro, NaF induces the downregulation of Bcl-2 in human fibroblasts, stimulating the mitochondrial cell death pathway [25]. After acute exposure to NaF in vivo, we did not observe a change in Bcl-2 gene expression (data not shown) or effector proteins of apoptosis caspases 3/7 in the kidney, whereas UN did induce these responses (Figure 8). Previous studies showed that U induces caspase-dependent apoptosis in normal rat kidney proximal cells [22] and that U induces the modulation of apoptosis-related genes in C57BL/6 mouse kidneys after a single dose of 5 mg/kg [57], which is relevant to our results. In contrast, we showed that the main death mechanism induced in acute NaF nephrotoxicity is necrosis, as revealed by histopathology scoring.

In addition to being implied in the clearance of apoptotic debris from the tubular lumen and conferring protection after an acute tubular injury, KIM-1 has also been identified as an inhibitor of innate immunity, inducing a decrease in pro-inflammatory cytokines and an increase in anti-inflammatory growth factor secretion [58]. The renal histopathology highlights the induction of interstitial inflammation after UN treatment at 5 mg/kg, but no inflammation was reported after NaF treatment. Some studies have shown pro-inflammatory gene induction in the kidney and an increase in inflammatory cytokine expression and production in the lungs after U exposures [57,59]. Similarly, F has been linked with inflammation in rat lung tissues and with endothelial dysfunction but these effects have not yet been shown in the kidney [60–62]. Our study also focused on the expression of the inflammatory markers ICAM and VCAM after acute in vivo exposure to NaF and UN in the kidney. The CAMs are cell adhesion proteins involved in immune cell recruitment during inflammation [63]. It is known that their expression is elevated in damaged kidneys [46,64,65]. ICAM and VCAM mRNA expression were significantly increased after NaF acute treatment, and ICAM in situ expression in the kidney was slightly increased after 10 mg/kg. Moreover, UN induced VCAM mRNA level in the renal tissue starting at 4 mg/kg UN. The in situ protein level of VCAM was also increased under our experimental conditions. Therefore, NaF and UN seem to induce inflammation as demonstrated by the overexpression of ICAM and VCAM in the kidney.

## 5. Conclusions

Overall, NaF and UN induced nephrotoxicity in mice with thresholds below 7.5 mg/kg NaF and between 2 and 4 mg/kg UN. Indeed, even if a dose of 2 mg/kg UN induces gene expression of nephrotoxicity biomarkers and apoptosis in the kidney, most of our results showed signs of nephrotoxicity at 4 mg/kg UN (HES staining, urinary biomarkers, KIM-1 in situ and inflammation). Moreover, KIM-1 quantification in the kidney seemed to be the most sensitive method to identify the threshold of nephrotoxicity for U and F. As shown by ICAM overexpression and overregulation after NaF treatment, inflammation was identified as a possible mechanism of F nephrotoxicity. Similarly, adhesion molecules were induced in the kidney by UN, but these data could be supplemented by other analyses on inflammatory cells. UN also induced caspase-dependent apoptosis 72 h after treatment, involving another mechanism of nephrotoxicity. The identification of the threshold of acute nephrotoxicity and of its mechanisms may be helpful to have a better understanding of U- and F-induced nephrotoxicity, but our data could be supplemented by other analyses confirming our results or identifying new mechanisms of toxicity.

**Author Contributions:** A.B. and Y.G. proposed the concept of the manuscript and designed the experimental study. A.B., Y.G. applied for research ethics approval. A.B., L.C., C.E., V.M., C.G., D.K. and Y.G. performed the experiments and collected data. All authors contributed to data analyses and interpretation. A.B. and Y.G. wrote the manuscript with intellectual input from K.T. and O.C.B. All authors read and provided input in finalizing the manuscript. Supervision and project administration was done by Y.G.

**Funding:** This research received no external funding.

**Acknowledgments:** We would like to thank Mohamed Amine Benadjaoud (IRSN/PSE-SANTE/SERAMED) for helpful discussions and precious advice for the statistical analyses using R software. We also thank the animal care team (IRSN/PSE-SANTE/SESANE/GSEA), including the zoological technicians Marine Gauthé, Romain Granger, Birame Mane, Amandine Sache, Frederic Voyer and Chrysostome Yiannakis as well as the veterinarian Delphine Denais Lalieuve.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Guéguen, Y.; Roy, L.; Hornhardt, S.; Badie, C.; Hall, J.; Baatout, S.; Pernot, E.; Tomasek, L.; Laurent, O.; Ebrahimian, T.; et al. Biomarkers for uranium risk assessment for the development of the CURE (Concerted Uranium Research in Europe) molecular epidemiological protocol. *Radiat. Res.* **2017**, *187*, 107–127. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Browne, D.; Whelton, H.; O'Mullane, D. Fluoride metabolism and fluorosis. *J. Dent.* **2005**, *33*, 177–186. [[CrossRef](#)]
3. Xiong, X.; Liu, J.; He, W.; Xia, T.; He, P.; Chen, X.; Yang, K.; Wang, A. Dose-effect relationship between drinking water fluoride levels and damage to liver and kidney functions in children. *Environ. Res.* **2007**, *103*, 112–116. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. UNSCEAR. Sources, effects and risks of ionizing radiation. In *UNSCEAR 2016 Report*; United Nations: New York, NY, USA, 2016.
5. Barbier, O.; Arreola-Mendoza, L.; Del Razo, L.M. Molecular mechanisms of fluoride toxicity. *Chem. Biol. Interact.* **2010**, *188*, 319–333. [[CrossRef](#)]
6. Vicente-Vicente, L.; Quiros, Y.; Perez-Barriocanal, F.; Lopez-Novoa, J.M.; Lopez-Hernandez, F.J.; Morales, A.I. Nephrotoxicity of uranium: Pathophysiological, diagnostic and therapeutic perspectives. *Toxicol. Sci.* **2010**, *118*, 324–347. [[CrossRef](#)]
7. Katz, S.A. The Chemistry and Toxicology of Depleted Uranium. *Toxics* **2014**, *2*, 50–78. [[CrossRef](#)]
8. Miller, A.C.; Stewart, M.; Rivas, R.; Marino, S.; Randers-Pehrson, G.; Shi, L. Observation of radiation-specific damage in cells exposed to depleted uranium: Hprt gene mutation frequency. *Radiat. Meas.* **2007**, *42*, 1029–1032. [[CrossRef](#)]
9. *Toxicological Profile for Fluorides, Hydrogen Fluoride, and Fluorine*; U.S. Agency for Toxic Substances and Disease Registry: Atlanta, GA, USA, 2003.
10. Paquet, F.; Houpert, P.; Blanchardon, E.; Delissen, O.; Maubert, C.; Dhieux, B.; Moreels, A.M.; Frelon, S.; Gourmelon, P. Accumulation and distribution of uranium in rats after chronic exposure by ingestion. *Health Phys.* **2006**, *90*, 139–147. [[CrossRef](#)]
11. Poisson, C.; Stefani, J.; Manens, L.; Delissen, O.; Suhard, D.; Tessier, C.; Dublineau, I.; Gueguen, Y. Chronic uranium exposure dose-dependently induces glutathione in rats without any nephrotoxicity. *Free Radic. Res.* **2014**, *48*, 1218–1231. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Usuda, K.; Kono, K.; Dote, T.; Nishiura, K.; Miyata, K.; Nishiura, H.; Shimahara, M. Urinary biomarkers monitoring for experimental fluoride nephrotoxicity. *Arch. Toxicol.* **1998**, *72*, 104–109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Manocha, S.L.; Warner, H.; Olkowski, Z.L. Cytochemical response of kidney, liver and nervous system of fluoride ions in drinking water. *Histochem. J.* **1975**, *7*, 343–355. [[CrossRef](#)]
14. Kathren, R.L.; Burklin, R.K. Acute chemical toxicity of uranium. *Health Phys.* **2008**, *94*, 170–179. [[CrossRef](#)]
15. Zamora, M.L.; Tracy, B.L.; Zielinski, J.M.; Meyerhof, D.P.; Moss, M.A. Chronic ingestion of uranium in drinking water: A study of kidney bioeffects in humans. *Toxicol. Sci.* **1998**, *43*, 68–77. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Gueguen, Y.; Rouas, C. Données nouvelles sur la néphrotoxicité de l'uranium. *Radioprotection* **2012**, *47*, 345–359. [[CrossRef](#)]



17. Zimmerman, K.L.; Barber, D.S.; Ehrich, M.F.; Tobias, L.; Hancock, S.; Hinckley, J.; Binder, E.M.; Jortner, B.S. Temporal clinical chemistry and microscopic renal effects following acute uranyl acetate exposure. *Toxicol. Pathol.* **2007**, *35*, 1000–1009. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Sangeetha Vijayan, P.; Rekha, P.D.; Dinesh, U.; Arun, A.B. Biochemical and histopathological responses of the Swiss albino mice treated with uranyl nitrate and its recovery. *Ren. Fail.* **2016**, *38*, 770–775. [[CrossRef](#)]
19. Dote, T.; Kono, K.; Usuda, K.; Nishiura, H.; Tagawa, T.; Miyata, K.; Shimahara, M.; Hashiguchi, N.; Senda, J.; Tanaka, Y. Toxicokinetics of intravenous fluoride in rats with renal damage caused by high-dose fluoride exposure. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **2000**, *73*, S90–S92. [[CrossRef](#)]
20. Santoyo-Sanchez, M.P.; del Carmen Silva-Lucero, M.; Arreola-Mendoza, L.; Barbier, O.C. Effects of acute sodium fluoride exposure on kidney function, water homeostasis, and renal handling of calcium and inorganic phosphate. *Biol. Trace Elem. Res.* **2013**, *152*, 367–372. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Pierrefite-Carle, V.; Santucci-Darmanin, S.; Breuil, V.; Gritsaenko, T.; Vidaud, C.; Creff, G.; Solari, P.L.; Pagnotta, S.; Al-Sahlane, R.; Den Auwer, C.; et al. Effect of natural uranium on the UMR-106 osteoblastic cell line: Impairment of the autophagic process as an underlying mechanism of uranium toxicity. *Arch. Toxicol.* **2017**, *4*, 1903–1914. [[CrossRef](#)]
22. Thiebault, C.; Carriere, M.; Milgram, S.; Simon, A.; Avoscan, L.; Gouget, B. Uranium induces apoptosis and is genotoxic to normal rat kidney (NRK-52E) proximal cells. *Toxicol. Sci.* **2007**, *98*, 479–487. [[CrossRef](#)]
23. Hao, Y.; Ren, J.; Liu, C.; Li, H.; Liu, J.; Yang, Z.; Li, R.; Su, Y. Zinc protects human kidney cells from depleted uranium-induced apoptosis. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2014**, *114*, 271–280. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Xu, B.; Xu, Z.; Xia, T.; He, P.; Gao, P.; He, W.; Zhang, M.; Guo, L.; Niu, Q.; Wang, A. Effects of the Fas/Fas-L pathway on fluoride-induced apoptosis in SH-SY5Y cells. *Environ. Toxicol.* **2011**, *26*, 86–92. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Lee, J.H.; Jung, J.Y.; Jeong, Y.J.; Park, J.H.; Yang, K.H.; Choi, N.K.; Kim, S.H.; Kim, W.J. Involvement of both mitochondrial- and death receptor-dependent apoptotic pathways regulated by Bcl-2 family in sodium fluoride-induced apoptosis of the human gingival fibroblasts. *Toxicology* **2008**, *243*, 340–347. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Zhao, Y.; Li, Y.; Wang, J.; Manthari, R.K. Fluoride induces apoptosis and autophagy through the IL-17 signaling pathway in mice hepatocytes. *Arch. Toxicol.* **2018**, *92*, 3277–3289. [[CrossRef](#)]
27. Hao, Y.; Huang, J.; Gu, Y.; Liu, C.; Li, H.; Liu, J.; Ren, J.; Yang, Z.; Peng, S.; Wang, W.; et al. Metallothionein deficiency aggravates depleted uranium-induced nephrotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2015**, *287*, 306–315. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Linares, V.; Belles, M.; Albina, M.L.; Sirvent, J.J.; Sanchez, D.J.; Domingo, J.L. Assessment of the pro-oxidant activity of uranium in kidney and testis of rats. *Toxicol. Lett.* **2006**, *167*, 152–161. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Ribeiro, D.A.; Cardoso, C.M.; Yujra, V.Q.; Viana, M.B.; Aguiar, O., Jr.; Pisani, L.P.; Oshima, C.T.F. Fluoride Induces Apoptosis in Mammalian Cells: In Vitro and In Vivo Studies. *Anticancer Res.* **2017**, *37*, 4767–4777.
30. Sun, Z.; Niu, R.; Wang, B.; Jiao, Z.; Wang, J.; Zhang, J.; Wang, S.; Wang, J. Fluoride-induced apoptosis and gene expression profiling in mice sperm in vivo. *Arch. Toxicol.* **2011**, *85*, 1441–1452. [[CrossRef](#)]
31. Singh, R.; Khatri, P.; Srivastava, N.; Jain, S.; Brahmachari, V.; Mukhopadhyay, A.; Mazumder, S. Fluoride exposure abates pro-inflammatory response and induces in vivo apoptosis rendering zebrafish (*Danio rerio*) susceptible to bacterial infections. *Fish Shellfish Immunol.* **2017**, *63*, 314–321. [[CrossRef](#)]
32. Dublineau, I.; Grandcolas, L.; Grison, S.; Baudelin, C.; Paquet, F.; Voisin, P.; Aigueperse, J.; Gourmelon, P. Modifications of inflammatory pathways in rat intestine following chronic ingestion of depleted uranium. *Toxicol. Sci.* **2007**, *98*, 458–468. [[CrossRef](#)]
33. Inkielewicz-Stepniak, I.; Czarnowski, W.; Krechniak, J. Determination of Fluoride in Soft Tissues. *Fluoride* **2003**, *36*, 16–20.
34. Rouas, C.; Stefani, J.; Grison, S.; Grandcolas, L.; Baudelin, C.; Dublineau, I.; Pallardy, M.; Gueguen, Y. Effect of nephrotoxic treatment with gentamicin on rats chronically exposed to uranium. *Toxicology* **2011**, *279*, 27–35. [[CrossRef](#)]
35. Cardenas-Gonzalez, M.C.; Del Razo, L.M.; Barrera-Chimal, J.; Jacobo-Estrada, T.; Lopez-Bayghen, E.; Bobadilla, N.A.; Barbier, O. Proximal renal tubular injury in rats sub-chronically exposed to low fluoride concentrations. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2013**, *272*, 888–894. [[CrossRef](#)]

36. Homma-Takeda, S.; Terada, Y.; Nakata, A.; Sahoo, S.K.; Yoshida, S.; Ueno, S.; Inoue, M.; Iso, H.; Ishikawa, T.; Konishi, T.; et al. Elemental imaging of kidneys of adult rats exposed to uranyl acetate. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B* **2009**, *267*, 2167–2170. [[CrossRef](#)]
37. Shashi, A.; Singh, J.; Thapar, S. Toxic effects of fluoride on rabbit kidney. *Fluoride* **2002**, *35*, 38–50.
38. Haley, D.P.; Bulger, R.E.; Dobyant, D.C. The long-term effects of uranyl nitrate on the structure and function of the rat kidney. *Virchows Arch. B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.* **1982**, *41*, 181–192. [[CrossRef](#)]
39. Kour, K.; Singh, J. Histological findings in kidneys of mice following sodium fluoride administration. *Fluoride* **1980**, *13*, 163–167.
40. McCay, C.M.; Ramseyer, W.F.; Smith, C.A. Effect of sodium fluoride administration on body changes in old rats. *J. Gerontol.* **1957**, *12*, 14–19.
41. Sanchez, D.J.; Belles, M.; Albina, M.L.; Sirvent, J.J.; Domingo, J.L. Nephrotoxicity of simultaneous exposure to mercury and uranium in comparison to individual effects of these metals in rats. *Biol. Trace Elem. Res.* **2001**, *84*, 139–154. [[CrossRef](#)]
42. Chattopadhyay, A.; Podder, S.; Agarwal, S.; Bhattacharya, S. Fluoride-induced histopathology and synthesis of stress protein in liver and kidney of mice. *Arch. Toxicol.* **2011**, *85*, 327–335. [[CrossRef](#)]
43. Machalinska, A.; Wiszniewska, B.; Tarasiuk, J.; Machalinski, B. Morphological effects of sodium fluoride on hematopoietic organs in mice. *Fluoride* **2002**, *35*, 231–238.
44. Fujigaki, Y. Different modes of renal proximal tubule regeneration in health and disease. *World J. Nephrol.* **2012**, *1*, 92–99. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Lombardi, D. How much can the tubule regenerate and who does it? An open question. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2016**, *31*, 1243–1250. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Gilbert, D.N.; Houghton, D.C.; Bennett, W.M.; Plamp, C.E.; Reger, K.; Porter, G.A. Reversibility of gentamicin nephrotoxicity in rats: Recovery during continuous drug administration. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1979**, *160*, 99–103. [[CrossRef](#)]
47. Xu, H.; Hu, L.S.; Chang, M.; Jing, L.; Zhang, X.Y.; Li, G.S. Proteomic analysis of kidney in fluoride-treated rat. *Toxicol. Lett.* **2005**, *160*, 69–75. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Bonventre, J.V. Kidney injury molecule-1 (KIM-1): A urinary biomarker and much more. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2009**, *24*, 3265–3268. [[CrossRef](#)]
49. Ko, G.J.; Grigoryev, D.N.; Linfert, D.; Jang, H.R.; Watkins, T.; Cheadle, C.; Racusen, L.; Rabb, H. Transcriptional analysis of kidneys during repair from AKI reveals possible roles for NGAL and KIM-1 as biomarkers of AKI-to-CKD transition. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* **2010**, *298*, F1472–F1483. [[CrossRef](#)]
50. Vaidya, V.S.; Ozer, J.S.; Dieterle, F.; Collings, F.B.; Ramirez, V.; Troth, S.; Muniappa, N.; Thudium, D.; Gerhold, D.; Holder, D.J.; et al. Kidney injury molecule-1 outperforms traditional biomarkers of kidney injury in preclinical biomarker qualification studies. *Nat. Biotechnol.* **2010**, *28*, 478–485. [[CrossRef](#)]
51. Iwakura, T.; Fujigaki, Y.; Fujikura, T.; Ohashi, N.; Kato, A.; Yasuda, H. Acquired resistance to rechallenge injury after acute kidney injury in rats is associated with cell cycle arrest in proximal tubule cells. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* **2016**, *310*, F872–F884. [[CrossRef](#)]
52. Fujigaki, Y.; Sun, D.F.; Goto, T.; Hishida, A. Temporary changes in macrophages and MHC class-II molecule-expressing cells in the tubulointerstitium in response to uranyl acetate-induced acute renal failure in rats. *Virchows Arch.* **2003**, *443*, 206–216. [[CrossRef](#)]
53. Correa-Rotter, R.; Ibarra-Rubio, M.E.; Schwochau, G.; Cruz, C.; Silkensen, J.R.; Pedraza-Chaverri, J.; Chmielewski, d.; Rosenberg, M.E. Induction of clusterin in tubules of nephrotic rats. *J. Am. Soc. Nephrol.* **1998**, *9*, 33–37. [[PubMed](#)]
54. Aulitzky, W.K.; Schlegel, P.N.; Wu, D.F.; Cheng, C.Y.; Chen, C.L.; Li, P.S.; Goldstein, M.; Reidenberg, M.; Bardin, C.W. Measurement of urinary clusterin as an index of nephrotoxicity. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1992**, *199*, 93–96. [[CrossRef](#)]
55. Brooks, C.R.; Yeung, M.Y.; Brooks, Y.S.; Chen, H.; Ichimura, T.; Henderson, J.M.; Bonventre, J.V. KIM-1-/TIM-1-mediated phagocytosis links ATG5-/ULK1-dependent clearance of apoptotic cells to antigen presentation. *EMBO J.* **2015**, *34*, 2441–2464. [[CrossRef](#)]
56. Ichimura, T.; Asseldonk, E.J.; Humphreys, B.D.; Gunaratnam, L.; Duffield, J.S.; Bonventre, J.V. Kidney injury molecule-1 is a phosphatidylserine receptor that confers a phagocytic phenotype on epithelial cells. *J. Clin. Invest.* **2008**, *118*, 1657–1668. [[CrossRef](#)]

57. Taulan, M.; Paquet, F.; Argiles, A.; Demaille, J.; Romey, M.C. Comprehensive analysis of the renal transcriptional response to acute uranyl nitrate exposure. *BMC Genomics* **2006**, *7*, 2. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Yang, L.; Brooks, C.R.; Xiao, S.; Sabbiseti, V.; Yeung, M.Y.; Hsiao, L.L.; Ichimura, T.; Kuchroo, V.; Bonventre, J.V. KIM-1-mediated phagocytosis reduces acute injury to the kidney. *J. Clin. Invest.* **2015**, *125*, 1620–1636. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Monleau, M.; De Meo, M.; Paquet, F.; Chazel, V.; Dumenil, G.; Donnadieu-Claraz, M. Genotoxic and inflammatory effects of depleted uranium particles inhaled by rats. *Toxicol. Sci.* **2006**, *89*, 287–295. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Aydin, G.; Cicek, E.; Akdogan, M.; Gokalp, O. Histopathological and biochemical changes in lung tissues of rats following administration of fluoride over several generations. *J. Appl. Toxicol.* **2003**, *23*, 437–446. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Miranda, L.C.; Viaro, F.; Ceneviva, R.; Evora, P.R. Endothelium-dependent and -independent hepatic artery vasodilatation is not impaired in a canine model of liver ischemia-reperfusion injury. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2007**, *40*, 857–865. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Wang, P.; Verin, A.D.; Birukova, A.; Gilbert-McClain, L.I.; Jacobs, K.; Garcia, J.G. Mechanisms of sodium fluoride-induced endothelial cell barrier dysfunction: Role of MLC phosphorylation. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **2001**, *281*, L1472–L1483. [[CrossRef](#)]
63. Akcay, A.; Nguyen, Q.; Edelstein, C.L. Mediators of inflammation in acute kidney injury. *Mediators Inflamm.* **2009**, *2009*, 137072. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Guerrero-Beltran, C.E.; Mukhopadhyay, P.; Horvath, B.; Rajesh, M.; Tapia, E.; Garcia-Torres, I.; Pedraza-Chaverri, J.; Pacher, P. Sulforaphane, a natural constituent of broccoli, prevents cell death and inflammation in nephropathy. *J. Nutr. Biochem.* **2012**, *23*, 494–500. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Li, J.J.; Lee, S.H.; Kim, D.K.; Jin, R.; Jung, D.S.; Kwak, S.J.; Kim, S.H.; Han, S.H.; Lee, J.E.; Moon, S.J.; et al. Colchicine attenuates inflammatory cell infiltration and extracellular matrix accumulation in diabetic nephropathy. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* **2009**, *297*, F200–F209. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).





## II. Mise en évidence de la réponse adaptative induite au niveau rénal après une exposition chronique à de faibles concentrations d'uranium et de fluor

### A. Contexte

Des études épidémiologiques ont montré une relation entre les concentrations d'uranium et de fluor retrouvées dans les eaux de boisson et la variation de certains marqueurs de néphrotoxicité observée chez certaines populations, cependant les résultats aux faibles doses restent très controversés (Jayasekara et al. 2015; Jimenez-Cordova et al. 2018; Kurttio et al. 2002; Kurttio et al. 2006; Lantz et al. 1987; Wasana et al. 2016; Xiong et al. 2007; Zamora et al. 1998; Zamora et al. 2009).

Les études expérimentales soulèvent également des questionnements sur les effets à faibles doses. Tandis que des effets néphrotoxiques ont été observés chez des rats exposés à l'uranium pendant 91 jours par ingestion de 0.96 mg/L d'uranium *via* l'eau de boisson (soit dès 0.06 mg/kg/jour) (Gilman et al. 1998), des études plus récentes réalisées à l'IRSN ont montré l'absence d'effet néphrotoxique à des doses pourtant bien supérieures (1 à 600 mg/L d'uranium *via* l'eau de boisson durant 9 mois) (Dublineau et al. 2014; Grison et al. 2016; Gueguen et al. 2014; Poisson et al. 2014). Une stimulation de la réponse antioxydante a été observée dans le rein, avec notamment une baisse de la peroxydation lipidique et une augmentation dose-dépendante du glutathion, laissant supposer la mise en place d'une réponse adaptative face à une exposition chronique de 9 mois à l'uranium (1 - 600 mg/L).

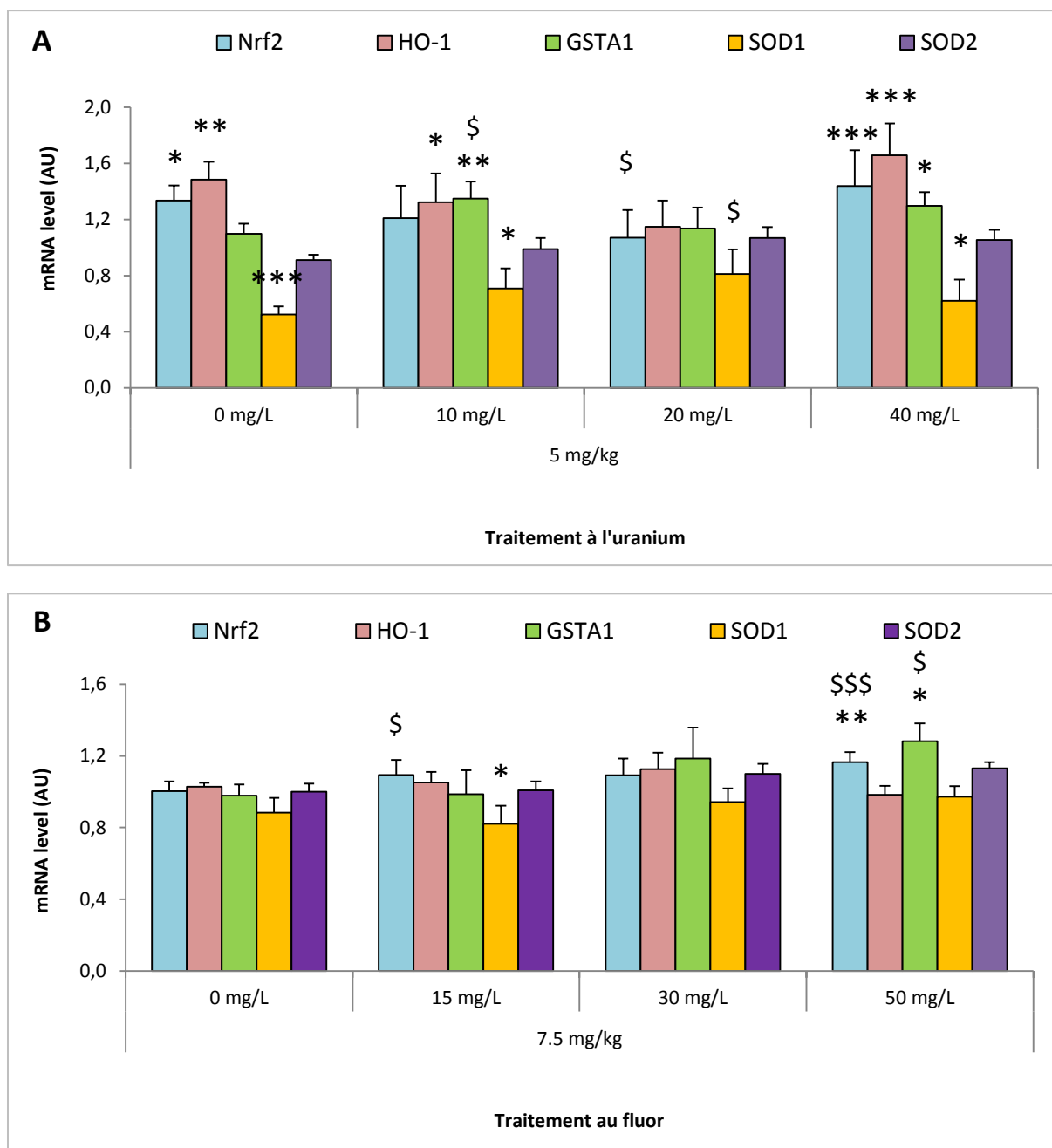
De manière comparable, les résultats d'études expérimentales menées sur les effets chroniques du fluor dans le rein soulèvent des questionnements. Le fluor semble induire une néphrotoxicité ainsi qu'un stress oxydatif dans les reins de rats buvant pendant 7 mois des eaux contenant entre 30 à 100 mg/L de fluor (Guan et al. 2000), tandis que d'autres études, avec des gammes de doses similaires, ont montré une absence de néphrotoxicité, ainsi qu'une stimulation de la réponse antioxydante et des HSP chez le rongeur (Cardenas-Gonzalez et al. 2016; Chattopadhyay et al. 2011).

### B. La réponse adaptative rénale suite à une exposition chronique au nitrate d'uranyle et au fluorure de sodium chez la souris

#### 1. Article

Dans le but d'identifier cette réponse adaptative rénale à faible dose d'uranium ou de fluor et d'en étudier les mécanismes sous-jacents, nous avons mis en place un protocole d'exposition spécifique. Ce protocole, tel que détaillé dans la partie Matériel et Méthodes, repose sur une contamination chronique de 6 mois à des doses prime d'uranium (10, 20 et 40 mg/L) ou de fluor (15, 30 et 50 mg/L), suivi d'un traitement challenge déterminé grâce aux résultats obtenus précédemment (5 mg/kg d'uranium ou 7.5 mg/kg de NaF).

L'apparition de la réponse adaptative est étudiée à travers une analyse histopathologique ainsi que l'expression génique et la sécrétion urinaire des biomarqueurs de néphrotoxicité CLU et KIM-1. Les



**Figure 43 : Expression de gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif dans les reins de souris exposées à l'uranium (A) ou au fluor (B)**

Les souris ont été exposées durant 6 mois à différentes doses d'uranium (0, 10, 20 et 40 mg/L) ou de fluor (0, 15, 30 et 50 mg/L) avant de recevoir une injection IP de respectivement 5 et 7.5 mg/kg d'uranium ou de NaF, et d'être euthanasiées 72 heures après. Les résultats sont exprimés en tant que ratio des niveaux d'ARNm des gènes de références GAPDH et HPRT. Tous les résultats sont présentés en tant que moyenne  $\pm$  SEM, avec des effectifs compris entre 10 et 12 pour chaque groupe. Un test de Holm-Sidak a permis de faire les analyses statistiques, avec une différence significative entre les groupes traités et leur groupe témoin négatif (0 mg/L + 0 mg/kg) (\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.005, \*\*\* $p$ <0.001), et une différence significative entre les groupes traités et leur groupe témoin positif (0 mg/L + 5 mg/kg d'uranium ou 7.5 mg/kg de NaF) ( $\$$   $p$ <0.05, \$\$  $p$ <0.005, \$\$\$  $p$ <0.001).

différents mécanismes suspectés comme intervenant dans la réponse adaptative sont étudiés à travers des études moléculaires des principaux facteurs de transcriptions intervenant dans les différentes voies de signalisation. L'apoptose est également quantifiée grâce à la mesure de l'activité enzymatique des caspases effectrices 3 et 7 tandis que l'inflammation est étudiée à travers les expressions des molécules CAMs impliquées dans le recrutement inflammatoire. Enfin, des analyses immunohistologiques de LC3B et d'IRE-1 $\alpha$  dans le rein permettent de voir l'induction de l'autophagie et de la réponse UPR, respectivement.

### *2. Résultats complémentaires*

Durant cette étude, les expressions d'autres gènes, notamment impliqués dans la réponse antioxydante (Nrf2, HO-1, GSTA1, SOD 1 et 2), ont été quantifiées. Les résultats obtenus après une contamination à l'uranium ne semblent pas montrer d'induction de ces gènes impliqués dans la réponse antioxydante dans nos conditions. Après une contamination au fluor nous observons cependant une légère activation des voies antioxydantes Nrf2 et GSTA1 (**figure 43**). En effet, les expressions de Nrf2 et de l'enzyme GSTA1 sont multipliées respectivement par 1.2 et 1.3 dans le groupe pré-exposé à 50 mg/L de fluor. Leurs expressions sont ainsi significatives en comparaison du groupe contrôle et du groupe recevant la dose challenge seule.





**ARTICLE 4**

**RENAL ADAPTIVE RESPONSE TO CHRONIC URANYL NITRATE AND SODIUM  
FLUORIDE EXPOSURES IN MICE**

Alice Bontemps Karcher, Victor Magneron, Laurine Conquet, Christelle Elie,  
Céline Gloaguen, Dimitri Kereselidze, Laurence Roy, Olivier C. Barbier, Yann  
Guéguen

À soumettre dans Toxicology and Applied Pharmacology



# Renal adaptive response to chronic uranyl nitrate and sodium fluoride exposures in mice

Alice Bontemps Karcher <sup>1</sup>, Victor Magneron <sup>1</sup>, Laurine Conquet <sup>1</sup>, Christelle Elie <sup>1</sup>, Céline Gloaguen <sup>1</sup>, Dimitri Kereselidze <sup>1</sup>, Laurence Roy <sup>1</sup>, Olivier C Barbier <sup>2</sup> and Yann Guéguen <sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> PSE-SANTE/SESANE, Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire IRSN, 92262 Fontenay-aux-Roses, France

<sup>2</sup> Departamento de Toxicología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Av. IPN No. 2508 Col., San Pedro Zacatenco, México City, CP 07360, Mexico

\* Correspondence: [yann.gueguen@irsn.fr](mailto:yann.gueguen@irsn.fr); Tel.: +33-158-359-978



**Abstract:**

Global population is exposed to uranium (U) and fluoride (F) because of their natural and anthropogenic presence in the environment. Both are nephrotoxicant at high doses, but their effects at low-doses are still subject to debate. This study aims to identify the adaptive response in the kidney of C57BL/6 mice exposed through drinking water to prime low-doses of U (0, 10, 20 and 40 mg/L) or F (0, 15, 30 and 50 mg/L) and then challenged with an intraperitoneal (IP) injection of 5 mg/kg U or 7.5 mg/kg NaF. The underlying mechanisms have been studied through enzymatic activities, gene and *in situ* protein expressions. We showed an adaptive response occurring with prime exposures between 10 and 20 mg/L U and 50 mg/L F, with decreased levels of mRNA and urinary excretion of the biomarkers KIM-1 and CLU compared to animals receiving the challenge dose only. Our results revealed that autophagy, the UPR and the recruitment of inflammatory cells were induced in all U-exposed mice, whereas a decrease of apoptosis was observed only in the 20 mg/L U group compared to the group receiving the challenge dose alone. F induced the UPR in all exposed groups, but not autophagy nor apoptosis. However, VCAM *in situ* expression was induced in all F-exposed groups, except in the pre-exposed group of 50 mg/L F. All put together, these data allow us to identify a renal adaptive response to U at 20 mg/L with a decrease of apoptosis, and to F at 50 mg/L with a potential reduction of inflammation.

**Keywords:** uranium; fluoride; kidney; adaptation; apoptosis; inflammation; autophagy; unfolded protein response



## 1. Introduction

Both U and F are environmental and anthropogenic contaminants for professional and global population. Indeed, workers can be exposed to U by working in fields such as mining and milling of U, or they can be exposed to F by the use of pesticides in the field of agriculture for example. Still, the main exposure to U and F for global population is through drinking water due to their natural presence in the environment. Because of their heterogeneous repartition in bedrocks and the varied human activities using these substances, U and F concentrations found in water can be very different from a place to another in the world. As an example, U concentrations were measured at 0.9 ng/L in Japanese cities potable water [1] and ranged from 0.03 to 0.08 µg/L in New York City, USA [2], whereas in Ontario, Canada, the mean concentration of U in treated drinking water was measured at 0.40 µg/L between 1990 and 1995 [3]. High concentrations of fluoride are found in the north-eastern region of Niger, reaching 2.07 mg/L in surface waters and 2.42 mg/L in groundwaters [4]. The highest concentrations found in drinking water were 20 mg/L for U [5, 6], and 30 to 50 mg/L for F [7], whereas the world health organization (WHO) recommended maximal concentrations are 30 µg/L U, and 1.5 mg/L F. [8, 9]

Once ingested, U and F mainly accumulated in the kidney [10-15], which is the most sensitive organ to U and F because of its function of filtration, transport and reabsorption [7, 11, 16, 17]. After high dose exposure of animals, U- and F-induced kidney lesions were mainly localized in the cortical and juxtaglomerular regions of the kidney, where are the proximal convoluted tubules (PCTs) [18-22]. Epidemiological studies have shown a relationship between U and F concentrations in drinking water and kidney damages developed in several populations, but evidences are still controversial in the low-dose range [13, 23-30]. In a same way experimental studies have shown that both U and F are nephrotoxics at high doses [18, 31-41], but the question regarding their adverse effects at low dose is still subject of debate. Gilman *et al* reported nephrotoxic effects in rats exposed to U during 91 days by ingestion (0.02 to 40 mg/kg) starting to the lowest level (0.04 µg/g of kidney tissue), and much lower than generally accepted in the literature [42]. A previous study of our laboratory have shown, thanks to histopathology and specific biomarkers, that a chronic contamination to different doses of U in rats, from 1 to 600 mg/L U in drinking water, did not induce any nephrotoxicity in spite of a renal accumulation known to be nephrotoxic when delivered acutely [21]. Moreover, it has been shown that a pre-exposure to subtoxic dose of U in rats could prevent the nephrotoxicity induced by an acute nephrotoxic treatment [43]. In their study, Poisson *et al.* (2014) showed that U even induced antioxidative mechanisms, such as the glutathione overexpression, which could let us suppose that a renal adaptation exists in response to low chronic doses of U, as also hypothesized in other *in vivo* and *in vitro* studies [44-46]. Similarly, the nephrotoxicity of F at low doses isn't clearly demonstrated. On the one hand, chronic exposures to F in rats, from 15 ppm to 100 ppm, induced a decrease of the number of nicotinic acetylcholine receptors





in the brain, lipid peroxidation in the red blood cells, brain and liver, and specific biomarkers of nephrotoxicity [47-50]. But on the other hand, it was shown that a chronic contamination to 15 or 50 ppm of F reduced the nephrotoxicity induced by a second exposure to gentamicin at high dose in rats [51]. The authors demonstrated that F induces cytoprotective factors such as the heat shock protein 72, also suggesting a potential adaptive response.

In the field of (radio)toxicology, there are two hypotheses to explain the effects of irradiations or chemicals: the linear response without threshold, and the non linear relation between dose and effects where there is no increased risk below a certain level (the threshold model). Lot of studies have shown another variant of the latest hypothesis: the non-monotonic dose-response model, which stipulates that below a certain level, low doses of radiations or chemicals can be beneficial for the organism [52-55]. The adaptive response is the ability for a biological system to exhibit less detrimental effects to a high exposure of toxicant when this latest has been pre-exposed to a small priming stress [56]. This adaptive response has been identified in several organisms after different exposures to irradiation or chemicals [56-61]. Olivieri et al. showed in 1984 that a first exposure to low concentrations of [<sup>3</sup>H]thymidine decreased the chromatid aberrations induced by a second exposure to X-rays in cells [55]. As explained above, a renal adaptive response to low doses of U and F is suspected but has not clearly been demonstrated in multicellular organisms, to this day. To identify clearly this renal adaptation to U and F, a model of exposure has been prepared, with chronic prime exposure to low doses of U or F, followed by a challenge treatment, delivered acutely and at nephrotoxic doses. This protocol will allow us to detect the low effects triggered by the prime exposures to low doses of U and F.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Animals

The study was performed with 8-week-old male C57BL/6J mice provided by Charles River (Saint Germain Nuelles, France), weighing  $25 \pm 5$  g at the beginning of the study. Animals were housed in groups of three under controlled conditions. Three weeks of acclimatization was provided before the beginning of the study. Water and food were supplied *ad libitum*. Body weight gain was monitored once a week and animals were housed for a 24-h period in metabolic cages every month. The study was approved by the IRSN Animal Care Committee #81 and conducted in accordance with French legislation on the protection of animals used for experimental purposes (EC Directive 2010/63/EU and French Decret 2013-118). All experiments were approved by the Ethics Committee #81 and authorized by the French Ministry of Research under the reference APAFIS#9324-2017031613376362 v1 (internal project number P16-05), delivered on 4 July 2017.

### 2.2. Chronic Exposure and acute contamination with U or F and Urine Collection

U was obtained as uranyl nitrate (UN) (Merck-Prolabo, Fontenay-sous-bois, France), with a specific activity of  $14 \times 10^3$  Bq/g and composed of 99.74% <sup>238</sup>U, 0.26% <sup>235</sup>U, and



0.001%  $^{234}\text{U}$ . F was obtained as sodium fluoride from Sigma (Saint-Quentin Fallavier, France). The ketamine (Imalgène 1000) and xylazine (5% Rompun) solutions were obtained from Centravet (Dinan, France).

Mice were divided into different groups as shown in Figure 1, chronically contaminated for 5 months with either U (10, 20, or 40 mg/L) or F (15, 30, or 50 mg/L) and then injected with an acute treatment of 5 mg/kg UN ( $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2$ ) or 7.5 mg/kg F (corresponding to 16.6 mg/kg NaF). Each U- and F-treated animals had their negative control groups, drinking Volvic water during chronic contamination and receiving a NaCl intraperitoneal injection (IP), and their positive control groups, drinking Volvic water during chronic contamination and receiving an injection with either 5 mg/kg UN or 7.5 mg/kg NaF. For chronic contaminations, UN and NaF were diluted in Volvic water and the drinking solutions were mixed with magnetic agitator. During the contamination period, drink consumption was monitored weekly. For the acute injections, UN and NaF were diluted in a NaCl solution and filtered the day of the injection. Animals were then euthanized 72 h later. The choice of the challenging doses and delay before euthanasia was based on previous results we obtained [32] and on literature. Previous experiments showed a peak of renal effects at 72 h post-injection for U and toxicity at the dose chosen [18, 34-36, 40, 62]. The experimental design and the animal distribution are presented in Figure 1.

Every month of the chronic contamination, and directly after the acute injection, the animals were housed individually in metabolic cages (Tecniplast, Decines Charpieu, France) for a 24-h period to collect urine samples. After collection, urine samples were subsequently centrifuged at 3000 g for 2 min at 4°C, and the supernatants were isolated and stored at -80°C.

### *2.3. Euthanasia and Kidney Collection*

Seventy-two hours after injection, the animals were anaesthetized by IP of 100 mg/kg ketamine and 10 mg/kg xylazine and euthanized by exsanguination. Both kidneys were collected, weighed and sagittally cut. Half the right kidney was placed in 4% formaldehyde for histopathological analysis, and the other half was used for U or F quantification. The entire left kidney was designated for biomolecular analysis after being flash-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C.

### *2.4. U and F Measurements in Urine and Kidney Tissue*

U was quantified in kidney by inductively-coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) (ICP-MS, PQ, Excell, Thermo Electron, Villebon-sur-Yvette, France), as previously described [21, 32]. The half-kidney was digested in nitric acid and hydrogen peroxide, and the samples were then evaporated and dissolved in nitric acid. After the appropriate dilution, the U content was measured using bismuth as an internal control and a U calibration curve. The detection limit of U was determined by ICP-MS: 0.5 ng/L for  $^{238}\text{U}$  and 0.01 ng/L for  $^{235}\text{U}$ . After dilutions, F was quantified in urine by a potentiometric method using an ion selective electrode (Thermo Scientific Orion, Villebon-sur-Yvette, France).



## *2.5. Histopathology and Immunostaining*

After 24 h in 4% formaldehyde, the preserved half-kidney was dehydrated before being embedded in paraffin and cut into 5 µm slices with a microtome. Hematoxylin, eosin, and saffron (HES) staining was conducted, and the slides were sent to an outside expertized laboratory of pathologists to perform the anatomopathological analyses (Biodoxis Laboratories, Romainville, France). Glomerular damage was defined by the presence of glomerulosclerosis and glomerular cystic dilatation, whereas tubular lesions were defined by the following: (1) necrosis; (2) regeneration and dilatation of the tubules; (3) interstitial inflammation; and (4) fibrosis. The different kinds of lesions were scored from 0 to 4 for each animal. The total sum of all lesions corresponded to the global scoring and the percentage of each lesion among the tubulointerstitial lesions was then calculated as previously described [32, 63]. Paraffin-embedded slices were deparaffinized and hydrated in descending gradations of ethanol and in 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diluted in PBS to block endogenous peroxidase activity. For kidney injury molecule-1 (KIM-1) staining, antigen retrieval was achieved with citrate buffer at pH=6. Sections were then incubated overnight with anti-KIM-1 (Abcam, Paris, France, ab47635) using a 200-fold dilution at 4°C in a moist chamber. After washing, the slices were incubated with Alexa Fluor goat anti-rabbit secondary antibody (Abcam, ab150061). Finally, the nuclei were stained with DAPI contained in Vectashield antifade mounting medium for fluorescence visualization. Ten photomicrographs per animal were collected with a LEICA DM 4000B fluorescence microscope, and semiquantification of fluorescent labeling was performed with Histolab Software (version 8.12, Microvision Instruments, Lisses, France). For intercellular adhesion molecule and vascular cell adhesion molecule (VCAM) staining, antigen retrieval was achieved with Tris/EDTA buffer at pH=9. Sections were then incubated for 1 hour with anti-ICAM-1 (Abcam, ab119871) diluted 250-fold or with anti-VCAM-1 (Abcam, ab134047) diluted 1000-fold at room temperature in a moist chamber. After washing, the slices were incubated with anti-rat and anti-rabbit secondary antibodies to be finally stained using a DAB revelation kit (MMFrance, Brignais, France). A counterstaining with hematoxylin was performed to identify renal structures. Ten photomicrographs per animal were collected with a DM 4000B microscope (LEICA, Paris, France) and semiquantification of stained area was performed using Histolab Software.

## *2.6. KIM-1 and CLU Detection in Urine*

KIM-1 and clusterin (CLU) were measured in urine samples using ELISA kits and according to the manufacturer's instructions (R&D Systems, Lille, France). To comply with the concentration intervals of the assay, the urine samples were diluted 1:100 for the CLU assay and 1:10 to 1:100 for the KIM-1 assay.

## *2.7. Real-Time RT-PCR*

Total RNA was extracted from the renal cortex by following the manufacturer's instructions (Total RNA isolation kit, Qiagen, Les Ulis, France) and was reverse-transcribed into cDNA with High-capacity cDNA reverse transcription kits (Applied Biosystems Life



Technologies, Courtaboeuf, France). Real-time polymerase chain reactions (RT-PCR) was made using two methods: SYBR Green and Taqman and with a final concentration of 1 ng/ $\mu$ L cDNA for 10  $\mu$ L per well, containing 2.5% v/v primers (Fisher Scientific, Illkirch, France), 83% v/v SYBR (Fisher Scientific, Illkirch, France), and 14.5% v/v sterile water. Table 1 reports accession number and primer sequences of each gene used in this study with SYBR Green method, whereas Table II reports accession number of Taqman genes used to analyze the mRNA levels of proteins involved in nephrotoxicity, inflammation, apoptosis, autophagy and unfolded protein response (UPR). The QuantStudio™ 12K Flex (Applied Biosystems Life Technologies, Courtabœuf, France) was used to detect real-time RT-PCR products. The comparative  $\Delta\Delta$ Ct method was used to determine relative quantification of each gene expression in comparison with the geometric average of the Ct values of housekeeping genes beta-actin (ACTB), hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). Finally, the fold induction for each treated group was calculated relative to the control group (NaCl).

**Table 1.** Primer sequences of the genes analyzed with real-time RT-PCR (SYBR Green)

Gene	Accession Number	Forward	Reverse
BAX	NM_007527	CCCCCGAGAGGTCTTCTT	GCGGCCCCAGTTGAAGT
BCL2	NM_009741	TGGGATGCCTTTGTGGAAC	CAGAGACAGCCAGGAGAAATCAA
CASP3	NM_001284409	CTGGACTGTGGCATTGAGACA	GCCTCCACCGGTATCTTCTG
CLU	AF182509	TCGGGCATCTGGCATCA	AAGCTCACGGGCGAAGAAC
GAPDH	GU214026	TCCACTCACGGCAAATTCACG	TAGACTCCACGACATACTCAGC
HPRT	NM_013556	TGCTGCGTCCCCAGACTTTTG	AGATAAGCGACAATCTACCAGAGG
ICAM-1	NM_010493	CACCCCAAGGACCCCAAGGAGAT	CGACGCCGCTCAGAAGAACCAC
KIM-1	BC053400	TTTCAGGCCTCATACTGCTTCTC	TGACCCACCACCCCTTT
VCAM-1	BC029823	TCGCGGTCTTGGGAGCCTCA	TGACCGTGACCGGCTTCCCA

**Table 2.** Accession numbers of Taqman genes used to analyze autophagy and UPR.

Gene	Accession Number	Taqman gene reference
ACTB	NM_007393.5	Mm02619580_g1
HPRT	NM_013556.2	Mm03024075_m1
GAPDH	NM_001289726.1	Mm99999915_g1
AMPK	NM_001013367.3	Mm01296700_m1
ATF4	NM_001287180.1	Mm00515325_g1
ATF6	NM_001081304.1	Mm01295319_m1
BECLIN1	NM_019584.3	Mm01265461_m1
DRAM1	NM_027878.2	Mm00503627_m1
DRAM2	NM_001025582.2	Mm00509019_m1
GRP78	NM_001163434.1	Mm00517691_m1
GRP94	NM_011631.1	Mm00441926_m1
IRE1-A	NM_023913.2	Mm00470233_m1
LC3-II	NM_026160.4	Mm00782868_sH
PERK	NM_010121.2	Mm00438700_m1
SESTRIN2	NM_144907.1	Mm00460679_m1





## 2.8. Cellular viability and cellular death measurements

Pieces of the renal cortex (25 mg) were put into 1.5 mL Eppendorf tubes with 250  $\mu$ L hypotonic buffer containing 25 mM HEPES, 5 mM  $MgCl_2$ , 1 mM EDTA, 1 mM Pefabloc, 1  $\mu$ g/mL pepstatin, 1  $\mu$ g/mL leupeptin, and 1  $\mu$ g/mL trypsin inhibitor. Then, the pieces were ground with micropestles and centrifuged at 13,000 rpm for 15 min at 4°C. The supernatants were collected and diluted 50-fold, and the protein concentrations of the supernatants were determined with a Bradford test. Then, sample was adjusted to 1 mg/mL before the determination of cellular viability, cytotoxicity and caspase activity with a detection kit (Promega “ApoTox-Glo™ Triplex Assay”, Charbonnières-les-Bains, France, G6320). The cleavage of the peptide GF-AFC substrate generates a fluorescent signal, which is used to measure the live-cell protease activity in the kidneys. Another fluorogenic peptide substrate, called bis-AAF-R110 substrate, is used to measure dead-cell protease activity released during the loss of the cellular membrane integrity. The caspase 3/7 activity is measured thanks to the release of luciferin after the cleavage of the luminogenic DEVD-peptide substrate by the caspases 3 and 7.

## 2.9. Statistical Analyses

Statistical analyses were performed using the SigmaPlot 11.0 software (Systat Software, Inc., Erkrath, Germany), except for the semiquantification of the immunostainings, for which Histolab Software was used as described previously (Microvision Instruments). A one-way analysis of variance (ANOVA) test was used to compare each group, and the Holm-Sidak method was applied for multiple comparisons. For the semiquantification of immunostainings, a general estimating equation (GEE) was performed using the R 3.4.4 (version 3.4.4, R Core Team, Boston, MA, USA) and RStudio software packages (version 1.1.423, RStudio Inc., Boston, MA, USA). The level of significance was set at  $p < 0.05$ .

# 3. Results

## 3.1. U and F metrology

The U content was measured in mouse kidney, 72 hours after IP treatment (Figure 2), whereas F content was measured in urines, 24 hours after IP treatment (Figure 3). The basal content of U in the kidneys of control non-exposed animals was very low (9.3 ng/g of tissue  $\pm$  0.3), corresponding to natural U as previously described [21, 32]. For all treated groups a significantly increased U content was observed ( $p < 0.001$ ), raising at a maximum of 8.70 ng/mg of tissue (Figure 2). The level of U in the kidney did not differ between groups whatever the contamination of U in the drinking water (10 to 40 mg/L). It was also similar to the level measured in animals only exposed to U by IP injection of 5 mg/kg.

The F metrology can only be performed in urines as the F tissue content in control and treated animals was too low to show any difference by potentiometry (data not shown) [32]. Urines were collected during two 24-hour periods, one before IP, and another directly after.



Before the acute treatment, only the F level of the 50 mg/L F group was significantly increased compared to the control group, with a concentration of 36.2  $\mu\text{g F}/24\text{h}$  ( $p < 0.05$ ) (data not shown), whereas after the IP treatment a significant increase of F in urines started from the lowest level of 15 mg/L (Figure 3). The control non-exposed animals showed basal level of 5.0  $\mu\text{g}/24\text{h}$  F, whereas the challenged animals excreted 94.3  $\mu\text{g}$  of F in urines 24 hours after IP treatment. The highest prime dose of 50 mg/L F induces an increase of F excretion (155.6  $\mu\text{g}/24\text{h} \pm 14.4$ ) significantly different from the 15 and 30 mg/L F exposed groups ( $p < 0.001$  and  $p < 0.05$ , respectively), confirming a dose-dependent increase of F chronic exposure on metrology.

### *3.2. Histopathological scoring in the kidney after U and F exposure*

72 hours after challenging, HES staining (Figure 4A) allowed us to assess a global scoring of damages induced in the kidney by U and F (Figure 4B). In addition, the extents of these damages (hyaline cast appearance, tubular vacuolization, necrosis and regeneration) were quantified for each experimental group (Figure 4C) as previously done in our studies [32, 63].

The extent of renal lesion was detected in a limited number of animals, with no significant increase between the scores of the exposed and control groups (Figure 4B). All animals of the control groups showed tubular vacuolization in their kidney, but with low severity ( $p > 0.05$ ). The global scoring was increased after U exposure, but not significantly, probably because of the basal damages of the non-exposed control animals. However, U did induce significantly the formation of hyaline casts, tubular vacuolization and necrosis in all treated animals compared to the negative control group ( $p < 0.005$  for hyaline casts in 10 mg/L U treated animals, and  $p < 0.001$  for all other lesions) (Figure 4C). Non-exposed animals presented tubular vacuolization, whereas hyaline cast formation and tubular necrosis were specifically induced after U exposure. Yet, no significant differences between pre-exposed animals and the positive control group have been observed under our experimental conditions, and no significant differences can be seen between the groups of animals exposed to U or F through drinking water. The HES scoring of F groups were similar, but to a lesser extent. Nevertheless, hyaline cast formation and tubular regeneration and necrosis appeared in some animals exposed to F, specifically.

The histopathologic analysis revealed that neither U nor F treatments induced glomerular damages in the kidney.

### *3.3. Biomarkers of U- and F-induced nephrotoxicity: KIM-1 and CLU mRNA, urinary secretion and in situ detection*

CLU and KIM-1 are proteins considered as early biomarkers for a wide of variety of acute and chronic renal impairments [64-67].

As shown in Figure 5A, the gene expression of KIM-1 was significantly increased by U and F challenge treatment with a 3.7- and 1.8-fold increase, respectively ( $p < 0.05$ ). Similarly, the gene expression of CLU was induced by U acute treatment in the kidney, with a 2.8-fold increase ( $p < 0.005$ ) (Figure 5B), but not after F acute exposure. Interestingly, for both U and F,



all groups exposed with the prime doses through drinking water had KIM-1 and CLU gene expressions induced significantly, except for the 20 mg/L U and the 50 mg/L F prime-exposed mice. Indeed, the KIM-1 and CLU expressions were non-significantly different from negative control at these concentrations, indicating a possible decrease of nephrotoxicity and a potential adaptive response to these doses.

When looking at these protein urinary excretions in Figures 5C and 5D, we can see that both proteins were significantly augmented in urines of animals receiving only the challenge dose of F, with 4.8- and 2.1-fold increases for KIM-1 and CLU, respectively. Interestingly, groups previously exposed to 15 and 30 mg/L F and then challenged by 7.5 mg/kg F injection had increased urinary secretions of KIM-1 and CLU, but not for the prime dose of 50 mg/L. Indeed, in these conditions (50 mg/L + 7.5 mg/kg), KIM-1 and CLU urinary levels were not significantly different compared to negative control. Their urinary levels were also significantly lower than the positive control (0 mg/L + 7.5 mg/kg) ( $p < 0.05$ ), confirming the hypothesis of a reduced nephrotoxicity and a potential adaptive response after a pre-exposure to 50 mg/L F. In the case of U, the treatment with the challenge dose alone did not induce KIM-1 or CLU 24 hours after injection. On the other hand, a prime exposure to 10 or 20 mg/L U reduced the basal level of CLU excretion in urines with 1.5- and 1.8-fold decreases, respectively ( $p < 0.05$  and  $p < 0.005$ ). These differences between urinary and mRNA levels could be explained by the difference of timing analysis (24 and 72 hours after IP injection, respectively), suggesting that U-induced nephrotoxicity can't be detected 24 hours after IP treatment but only after a longer period (48 or 72 hours).

The *in situ* detection of KIM-1 is shown on Figure 6. This protein was detected in proximal tubules of some control animals, revealing a basal level of renal impairment, and in all U- and F-exposed mice (Figures 6A and 6C). In the group exposed to 50 mg/L F, only a few animals showed KIM-1 *in situ* expression in the kidney. The scoring of *in situ* KIM-1 was calculated relatively to the control group (fixed at 1.0), and revealed that U acute treatment alone significantly induced the protein expression in the kidney, with a 5.1-fold increase ( $p < 0.05$ ), whereas F did not, as shown in Figures 6B and 6D. A significant increase of KIM-1 was detected in all groups prime exposed to U ( $p < 0.001$ ), except at the dose of 10 mg/L. In the case of F, KIM-1 *in situ* expression in the kidney was not significantly induced in any group, even if a tendency is observed in mice contaminated with 15 and 30 mg/L F before challenging, with 4.2- and 3.1-fold increases, respectively. Interestingly, the chronic prime exposure to 50 mg/L F lead to a level of KIM-1 which appeared to be lower than the level of negative controls (50% of the basal expression). Still these results are in accordance with the gene expression of KIM-1 and its urinary excretion, and consolidate the hypothesis of an adaptive response for the group exposed to a prime concentration of 50 mg/L F.

#### 3.4. Gene expression of factors involved in the potential adaptive mechanisms of U and F

The mRNA expression of the genes shown on figure 7 allow us to have a general guidance on the mechanisms potentially implied in the renal adaptive response to U and F.



The fold induction of each group was calculated relative to the control group which was fixed to a mRNA level of 1.0 (group not shown on the figure).

ICAM and VCAM are both proteins involved in the recruitment of inflammatory cells, and therefore are good markers for the potential inflammation induced by U and F. The mRNA level of ICAM wasn't induced in the group of animals receiving challenge dose alone whereas it was induced by 1.9 and 2.0-fold in the kidney of mice receiving the prime doses of 10 and 40 mg/L U ( $p < 0.005$  and  $p < 0.001$ , respectively). In animals receiving the U challenge dose alone, or with a prime exposure to 10 mg/L, the overexpression of VCAM was slightly induced ( $p < 0.05$ ). No induction of either ICAM or VCAM has been observed at the prime concentration of 20 mg/L, suggesting that no inflammation is induced at this concentration (Figure 7A). By contrast, no induction of either ICAM or VCAM mRNA expression can be observed after F exposures under our conditions (Figure 7B).

Bax and Bcl2 are known to be pro- and anti-apoptotic proteins, whereas the gene Casp-3 is coding for the effector apoptotic protein caspase 3. Under our conditions, all groups of mice receiving the challenging dose of U, with or without prime exposures, showed a slightly increased expression of the anti-apoptotic protein Bcl2, not exceeding 1.4-fold increase ( $p < 0.05$  to  $p < 0.001$ ) (Figure 7A). By contrast, the gene expression of the pro-apoptotic protein Bax was increased only after a prime exposure to 10 mg/L U ( $p < 0.005$ ), but with a low fold increase of 1.2. No induction of Casp-3 was observed after U exposure under our conditions. By contrast with U, no induction of Bcl2, Bax or Casp-2 gene expressions have been induced with the challenging dose of F (Figure 7B). However, a slight 1.2-fold induction of Bcl2 mRNA has been observed in all groups of mice exposed to the prime concentrations of F ( $p < 0.05$ ), whereas the gene expression of Bax was increased only after a prime exposure to 15 mg/L F ( $p < 0.05$ ). Bax and Casp-3 gene expressions were significantly reduced compared to the positive control group after a prime exposure to 30 mg/L F.

Beclin1 and LC3-II are both genes coding for proteins involved in autophagy, whereas Sestrin2, AMPK and DRAMs are genes known to be induced by autophagy. In the case of U, as seen on figure 7A, the gene expression of AMPK was slightly increased, with a 1.2-fold increase, in animals treated with the challenge dose alone ( $p < 0.005$ ), whereas the same treatment significantly reduced the gene expression of DRAM2 ( $p < 0.001$ ). Mice previously contaminated with the prime doses of U also showed increased mRNA levels of AMPK, but with a low 1.3-fold induction ( $p < 0.001$ ). Interestingly, the groups which have received the prime doses of 20 and 40 mg/L presented significantly higher AMPK gene expression than the positive control group receiving the challenge dose alone ( $p < 0.05$ ). By contrast, all groups exposed to prime doses of U showed significantly reduced gene expression of DRAM2 ( $p < 0.001$ ), similarly to the positive control group, whereas the prime dose of 10 mg/L U increased the mRNA expression of DRAM1 ( $p < 0.005$ ). At the same prime dose of 10 mg/L U, mice presented a small increased level of LC3-II mRNA expression ( $p < 0.05$ ), a protein known to be involved in the autolysosome formation, and therefore in the last step of autophagy. As seen on figure 7B, the F challenge dose didn't induce any of the genes implied in autophagy we've investigated. However, F induced DRAM2 gene expression in the





group exposed to 50 mg/L and then treated with the challenge dose of 7.5 mg/kg NaF when compared to the negative and positive controls ( $p < 0.05$  and  $p < 0.005$ , respectively). Moreover, at the prime dose of 30 mg/L F the mRNA expression of sestrin2 was significantly decreased compare to the negative and positive control groups ( $p < 0.001$  and  $p < 0.05$ , respectively).

PERK, ATF6, IRE1- $\alpha$ , and ATF4 are involved in the three pathways of the UPR and GRP78 and GRP94 are both genes induced by this biological response. Interestingly, ATF4 gene expression was induced in all groups treated with U (Figure 7A), either they had a prime exposure or not before being challenged ( $p < 0.001$ ). Nevertheless, only the animals pre-exposed to 10 and 20 mg/L U showed an increased IRE1- $\alpha$  mRNA level compared to the negative control group ( $p < 0.05$ ), and GRP78 gene expression was also increased after the prime exposure of 10 mg/L followed by the challenge dose ( $p < 0.05$ ). By contrast, there was no induction of the genes involved in the UPR after F treatments, as seen in figure 7B.

To sum up, figures 7A and 7B showed that U challenging treatment induced the expression of genes involved in inflammatory cell recruitment, apoptosis, autophagy and in the UPR, whereas none of these genes were induced after F challenging in mice. A summary of the gene results are presented in Tables 3 and 4, showing the potential implication of these mechanisms in the adaptive response we have observed. It seems U prime exposures slightly induce genes involved in all these mechanisms, whereas only genes implied in apoptosis and autophagy were slightly modulated by F prime exposures. To explore further the implication of these mechanisms, we observed specific markers, thanks to enzymatic activity measurements and *in situ* immunochemistries.

**Table 3.** Summary table of the mRNA expressions of genes involved in inflammation, apoptosis, autophagy, and UPR after U exposures.

U exposure	0 mg/L	10 mg/L	20 mg/L	40 mg/L
	5 mg/kg	5 mg/kg	5 mg/kg	5 mg/kg
<b>Inflammation</b>	↗ VCAM *	↗ VCAM * ↗ ICAM **	∅	↗ ICAM ***, <sup>§</sup>
<b>Apoptosis</b>	↗ Bcl2 *	↗ Bcl2 * ↗ Bax **	↗ Bcl2 **	↗ Bcl2 ***
<b>Autophagy</b>	↗ AMPK ** ↘ DRAM2 ***	↗ AMPK *** ↘ DRAM2 *** ↗ DRAM1 ** ↗ LC3-II *, <sup>§</sup>	↗ AMPK *, <sup>§</sup> ↘ DRAM2 ***	↘ Beclin1 ** ↗ AMPK ***, <sup>§</sup> ↘ DRAM2 *** ↘ Sestrin2 *
<b>UPR</b>	↗ ATF4 *** ↗ GRP78 *	↗ ATF4 *** ↗ IRE1 $\alpha$ * ↗ GRP78 *	↗ ATF4 *** ↗ IRE1 $\alpha$ *	↗ ATF4 ***

↗: increase ; ↘: decrease ; ∅: no modulation ; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$ , and \*\*\* $p < 0.001$  versus negative control ;  
<sup>§</sup> $p < 0.05$ , <sup>§§</sup> $p < 0.005$  versus positive control



**Table 4.** Summary table of the mRNA expressions of genes involved in inflammation, apoptosis, autophagy, and the UPR after F exposures.

F exposure	0 mg/L	15 mg/L	30 mg/L	50 mg/L
	7.5 mg/kg	7.5 mg/kg	7.5 mg/kg	7.5 mg/kg
Inflammation	∅	∅	∅	∅
Apoptosis	∅	↗ Bcl2 * ↗ Bax *	↗ Bcl2 * ↘ Bax \$ ↘ Casp-3 *, \$	↗ Bcl2 *
Autophagy	∅	∅	↗ DRAM2 \$ ↘ Sestrin2 ***, \$	↗ DRAM2 *, \$\$
UPR	∅	∅	↘ ATF4 **, \$ ↘ GRP94 * ↘ IRE1α **	↘ GRP94 *, \$

↗: increase ; ↘: decrease ; ∅: no modulation ; \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.005$ , and \*\*\* $p<0.001$  versus negative control ; \$ $p<0.05$ , \$\$ $p<0.005$  versus positive control

### 3.5. ICAM-1 and VCAM-1 *in situ* expression in the kidney

To see if either U or F can induce the recruitment of inflammatory cells in the kidney, the quantification of ICAM-1 and VCAM-1 *in situ* expression was done. A basal level of CAMs proteins was detected in the control groups (Figure 8A and 8B), and the quantifications of *in situ* ICAM and VCAM were calculated relative to the control group (fixed at 1.0). Mice didn't show any significant induction of ICAM-1 in the kidney after U challenging treatment (Figure 8C), but on the other hand, U did induce VCAM-1 expression in the kidney of mice challenged with 5 mg/kg, either they have received prime exposure or not ( $p<0.05$ ) (Figure 8D). It seems that a prime exposure to 20 mg/L U induced the level of ICAM-1 significantly, with a 1.5-fold induction compared to control ( $p<0.05$ ). When challenged with F, mice didn't show any significant induction of ICAM-1 in the kidney (Figure 8C), but showed a 1.4-fold induction of VCAM-1 *in situ* expression ( $p<0.05$ ) (Figure 8D). A prime exposure to 30 mg/L F, followed by a challenge injection of F, induced the *in situ* level of ICAM-1 significantly, with a 2.2-fold induction compared to control ( $p<0.005$ ). On the other hand, the groups exposed to the prime doses of 30 and 50 mg/L F showed significant lower level expressions of VCAM-1 compared to the positive control group receiving the challenge dose alone ( $p<0.001$  and  $p<0.005$ , respectively), but didn't show any significant difference with non-exposed animals.

### 3.6. Viability and cellular death measurements in the kidney

Cellular viability and death were studied through enzymatic activities in tissue homogenates prepared from the renal cortex (Figure 9). A challenging treatment of 5 mg/kg U induced both cytotoxicity and apoptosis, with 155 and 122% of the control basal level, respectively ( $p<0.05$ ). Under our conditions, prime exposures to 10 or 20 mg/L U cancelled



the cytotoxicity induced by the U challenge dose alone. Moreover, the contamination to 20 mg/L U through drinking water also cancelled the apoptosis induced by U challenge injection. Indeed, this group didn't present significant differences with the non-exposed control group, and its caspase 3/7 activity was significantly lower than the positive control group ( $p < 0.001$ ). In the case of F treatments, all groups presented similar rates of cellular viability and death compared to the negative control group, except for the 15 mg/L F pre-exposed mice that presented a small decrease, with 87% of the basal caspase 3/7 activity ( $p < 0.05$ ). In conclusion, F did not modulate cellular viability or death at our working concentrations, but a renal adaptive response to U-induced cytotoxicity and apoptosis at the chronic exposure of 20 mg/L U in mice is suggested.

### 3.6. LC3-II *in situ* measurement in the kidney and induction of autophagy

LC3-II is the form of microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 (LC3), which is conjugated to phosphatidylethanolamine, and recruited in the autophagosomal membranes [68]. Therefore, the induction of autophagy in the kidney cells has been studied through the immunodetection of the protein LC3-II *in situ* (Figure 10).

In unexposed animals, no level of LC3-II was detected, as shown on Figure 10A. U induced LC3-II in the kidney of mice challenged, whether the animals were pre-exposed to prime doses of U or not, with scorings from 1.6 to 2.3 ( $p < 0.001$ ) (Figure 10A and 10B). Indeed, the scattered staining, noticeable in positive control and 10 or 20 mg/L U pre-exposed groups, indicates the formation of LC3-II from the cytosolic protein LC3-I, whereas LC3-II spots, particularly noticeable in the zoomed picture of a 40 mg/L U pre-exposed mouse, indicate the recruitment of the protein in the autophagosomal membranes. In addition, whatever the type of exposure (challenged animals with or without prime exposures), F did not induce LC3-II *in situ* expression.

### 3.7. IRE1- $\alpha$ *in situ* measurement in the kidney and induction of the UPR

The IRE1- $\alpha$  protein is mainly involved in one of the three known pathways for the UPR induction. Therefore, its overexpression in the cellular cytosol is a good marker for the study of the UPR induction after our contaminations.

In unexposed animals, there was a basal level of stained tubules (approximately 24-30%), as it is observable on Figure 11A. Animals challenged with U showed a significant increase of IRE1- $\alpha$  *in situ* expression compared to the non-exposed control group ( $p < 0.05$ ), as the animals previously exposed to prime doses of U, with a rate of stained tubules up to 35% ( $p < 0.001$ ) (Figures 11B). The F challenge dose alone induced IRE1- $\alpha$  *in situ* compared to the non-exposed control group ( $p < 0.001$ ) (Figure 11C), similarly as in the prime exposed groups to 15, 30 and 50 mg/L ( $p < 0.005$ ,  $p < 0.001$  and  $p < 0.001$ , respectively). Interestingly, the animals exposed to 50 mg/L F through drinking water presented an overexpression of the *in situ* protein compared to the group pre-exposed to 15 mg/L ( $p < 0.05$ ). Moreover, this group presented a higher expression of IRE1- $\alpha$  than the positive control group, but not statistically significant ( $p = 0.068$ ).



#### 4. Discussion

Adaptive response is a common process occurring at low doses of exposure to chemical or radiation stress [54, 56, 57]. To bring to light the adaptive response, the most frequently described protocol is the challenging process, following a previous prime exposure at low-dose [45, 55, 69]. In the research field of toxicology it is shown that low-dose exposure may lead to non-monotonic dose responses, possibly beneficial, or detrimental to the organism [60]. It is known that U and F are both nephrotoxic agents after acute exposures [18, 31-38], but previous studies among ours have shown that U and F may trigger a renal adaptive response after chronic low-dose exposures [21, 43-45, 51].

This work allows us to show this adaptive response for U and F exposures to chronic low doses, thanks to a specific protocol based on a prime chronic prime exposure to low doses of U or F, followed by a challenge treatment, delivered acutely and at nephrotoxic doses. The challenging dose has been previously selected from our recent study of U and F acute treatments [32]. Our results have confirmed those obtained previously and allow us to validate our challenging protocol.

Interestingly, in this study we have shown that adaptive response is induced after prime exposures to 20 mg/L for U, and 50 mg/L for F. A pre-exposure to 20 mg/L U decreased the overexpression of CLU and KIM-1 mRNA triggered by the challenging dose of 5 mg/kg U, without any difference relative to negative control (Figure 5A and 5B). On the other hand, U induces the KIM-1 *in situ* level in every group (challenge, or prime + challenge), except in the pre-exposed 10 mg/L U group. Put together, these data suggest that the renal adaptive response to U observed under our conditions mainly occurs at 20 mg/L. Our previous studies done in rodents have shown that 9 months of exposure to 40 mg/L U did not induce renal histological lesions or the induction of nephrotoxic biomarkers [46, 63], with no changes in the glomerular filtration rate [21, 70], and could induce renoprotective mechanisms such as the induction of glutathione [21]. Moreover, several studies have shown that UN wasn't nephrotoxic when delivered chronically in rodents with concentrations ranged from 1 to 600 mg/L UN [21, 46, 63, 70], despite a previous study showing appearance of tubular lesions, after a 28- or 91-day exposure to doses ranged from 0.96 to 600 mg/L, but without increase severity with dose [42]. The renal adaptive response triggered by U in drinking water isn't clearly identify, but it was previously described that U was able to induce renoprotective response *in vivo* after a single acute sub-toxic dose of UN [43, 45]. Our study is the first one to clearly demonstrate that U does induce a renal adaptive response *in vivo* after a chronic exposure to low doses of U in drinking water. In the case of F, the mRNA levels and the urinary protein secretions of CLU and KIM-1 both revealed an adaptive response to F at 50 mg/L (Figure 5). Indeed, the KIM-1 and CLU levels of this group weren't significantly different from the negative control group, whereas the mRNA expression and the urinary secretion of these proteins were significantly decreased compared to the group of animals receiving the challenge dose alone. Interestingly, a chronic exposure of 40 days to this concentration of 50 mg/L F seems to induce nephrotoxic biomarkers such as KIM-1, CLU or OPN gene and urinary protein levels in rats [47], but without any histological damage after a 60-day period of





exposure [71]. Yet, when we use the same dose as a prime exposure before challenging a decrease in F-induced nephrotoxicity, gene expressions and protein secretions of KIM-1 and CLU was observed, compared to the challenged group [51]. These last findings are in accordance with our results and confirmed the adaptive response seen at 50 mg/L F.

The mechanisms involved in this adaptive response have been studied for a better comprehension of toxicological effects of low dose exposure to U or F. Several mechanisms were described in the literature as involved in the adaptive response to chemicals or irradiation [56]. Among them apoptosis, autophagy, the modulation of inflammation and the UPR are reported to be induced by U and F in the literature [47, 51, 72-75] and could be involved in U and F adaptive response. It has previously been shown that autophagy was able to reduce the toxic effects induced by U in other organs than the kidney [73, 76], or induced by other chemicals in the kidney [77]. But to our knowledge, we are the first to demonstrate that autophagy is induced by U in the kidney, *in vivo*. Indeed, thanks to the gene screening (Figure 7), we have seen that the groups of 20 and 40 mg/L U showed an adaptive increase of AMPK gene expression, and that the prime dose of 10 mg/L induced LC3-II, and DRAM1, a gene known to be induced by autophagy. Moreover, animals pre-exposed to 10 and 20 mg/L U had an increased IRE1- $\alpha$  mRNA level, whereas the challenge dose alone did not induce IRE1- $\alpha$  gene expression. Therefore it was interesting to explore further the potential implication of autophagy and UPR in the adaptive response seen between 10 and 20 mg/L prime exposures to U under our conditions. Interestingly, our results showed the induction of autophagy and UPR after U challenging, whether or not there is a prime exposure (Figures 10 and 11). UPR is also induced by F, in animals receiving challenging dose alone, or receiving challenging dose after pre-exposure to prime doses. This is the first study to show that U or F induces UPR in the kidney *in vivo* as well. Nevertheless, our results do not clearly identify autophagy and UPR as mechanisms involved in the adaptive response observed under our conditions. But still, we cannot exclude these mechanisms are partly involved in the adaptive response as it would be possible that autophagy and/or UPR are induced during the prime exposure, preventing the kidneys from the following challenging dose, or after a recovery period between prime and challenge doses. Further studies will be necessary to investigate the induction of these mechanisms in other timing of exposure, but with similar doses. The gene screening shown in figure 7 indicates that inflammation could be a mechanism explaining the adaptive response to U and F, with the modulation of CAMs mRNA expressions. Moreover, in the case of U, it has been shown that inflammation could be modulated in other organs such as the intestine, after chronic ingestions of U in rodents [70, 78]. But our results showed that U induces VCAM-1 in the kidney of challenged mice (Figure 8B), whether mice have received prime exposures in drinking water or not. Therefore, similarly to autophagy and the UPR, the modulation of inflammatory cells recruitment can't be identified as a mechanism of the adaptive response to U with our results. Interestingly, in the case of F, VCAM-1 was induced in the kidney by the challenge dose alone, but not when mice were exposed to the prime doses of 30 and 50 mg/L F. This decrease of VCAM-1 *in situ* expression could trigger a



reduction of the renal inflammation induced by the challenge dose alone, and that could partly explain the adaptive response to F observed at 50 mg/L, under our conditions. As ICAM-1 is overexpressed in the kidney of animals pre-exposed to 30 mg/L F, no conclusions can be drawn about the potential recruitment of inflammatory cells in the group of mice receiving this prime exposure (Figure 8A). Another mechanism studied, apoptosis, has been identified as a mechanism involved in adaptive response to U under our conditions, whereas no changes have been observed for F exposures (Figure 9). Indeed, both groups of animals with prime exposures to 20 and 40 mg/L U followed by challenging have similar caspase 3/7 levels compared to controls. Moreover, the prime exposure to 20 mg/L U significantly reduced the caspase 3/7 activity induced by the challenging dose alone, allowing us to hypothesize that apoptosis is at least partly involved in the adaptive response to U. In comparison to other metals, such as cadmium, it has been shown that chronic exposures reduced oxidative stress, and induced less apoptosis compared to acute exposures [79, 80]. By contrast to our data, F could induce apoptosis and autophagy in mice hepatocytes after a chronic exposure to 50 mg/L NaF during 150 days [81]. But this difference can be explained by a tissue specific response or the duration of exposure.

As a whole, our data showed the existence of an adaptive response to low doses of U and F after chronic exposures of respectively 20 and 50 mg/L in mice, with the induction of adaptive mechanisms such as apoptosis and inflammatory regulation. These results allow to have a better understanding of the potential effects of U and F low chronic exposures on global population, and to provide new knowledge for radioprotection.

#### Bibliography

1. Nozaki, T., et al., *Neutron activation analysis of uranium in human bone, drinking water and daily diet*. J. Radioanal. Nucl. Chem., 1970. **6**(1): p. 33-40.
2. Fisenne, I.M. and G.A. Welford, *Natural U concentrations in soft tissues and bone of New York City residents*. Health Phys, 1986. **50**(6): p. 739-46.
3. OMME, *Monitoring data for uranium-1990-1995, 1996*, Ontario Ministry of Environment and Energy, Ontario Drinking Water Surveillance Program: Toronto, Ontario, Canada.
4. Waziri, M., U. Musa, and S.S. Hati, *Assessment of fluoride concentrations in surface waters and groundwater sources in northeastern Nigeria*. Resour Environ, 2012. **2**(2): p. 67-72.
5. Juntunen, R., *Etelä-Suomen kallioporakajojen uraani- ja radontutkimukset (Uranium and radon in wells drilled into bedrocks in southern Finland)*. Report of Investigation, Geological Survey of Finland, Espoo, 1991. **98**.
6. Salonen, L., *<sup>238</sup>U series radionuclides as a source of increased radioactivity in groundwater originating from Finnish bedrock*. Future Groundwater Resources at Risk (Proceedings of the Helsinki Conference, June 1994), 1994. **222**.
7. Barbier, O., L. Arreola-Mendoza, and L.M. Del Razo, *Molecular mechanisms of fluoride toxicity*. Chem Biol Interact, 2010. **188**(2): p. 319-33.
8. WHO, *Fluoride in drinking-water*, 2006: Switzerland.
9. WHO, *Guidelines for drinking-water Quality*, 2011, World Health Organization: Geneva, Switzerland.



10. Browne, D., H. Whelton, and D. O'Mullane, *Fluoride metabolism and fluorosis*. J Dent, 2005. **33**(3): p. 177-86.
11. Guéguen, Y., et al., *Biomarkers for uranium risk assessment for the development of the CURE (Concerted Uranium Research in Europe) molecular epidemiological protocol*. Radiation Research, 2017. **187**(1): p. 107-127.
12. UNSCEAR, *Sources, effects and risks of ionizing radiation*, 2016, United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation: U.S.
13. Xiong, X., et al., *Dose-effect relationship between drinking water fluoride levels and damage to liver and kidney functions in children*. Environ Res, 2007. **103**(1): p. 112-6.
14. La Touche, Y.D., D.L. Willis, and O.I. Dawydiak, *Absorption and biokinetics of U in rats following an oral administration of uranyl nitrate solution*. Health Phys, 1987. **53**(2): p. 147-62.
15. Craft, E., et al., *Depleted and natural uranium: chemistry and toxicological effects*. J Toxicol Environ Health B Crit Rev, 2004. **7**(4): p. 297-317.
16. Vicente-Vicente, L., et al., *Nephrotoxicity of uranium: pathophysiological, diagnostic and therapeutic perspectives*. Toxicol Sci, 2010. **118**(2): p. 324-47.
17. Katz, S.A., *The Chemistry and Toxicology of Depleted Uranium* Toxics, 2014. **2**(1): p. 50-78.
18. Dote, T., et al., *Acute renal damage dose response in rats to intravenous infusion of sodium fluoride*. Fluoride, 2000. **33**(4): p. 210-217.
19. Manocha, S.L., H. Warner, and Z.L. Olkowski, *Cytochemical response of kidney, liver and nervous system of fluoride ions in drinking water*. Histochem J, 1975. **7**(4): p. 343-55.
20. Paquet, F., et al., *Accumulation and distribution of uranium in rats after chronic exposure by ingestion*. Health Phys, 2006. **90**(2): p. 139-47.
21. Poisson, C., et al., *Chronic uranium exposure dose-dependently induces glutathione in rats without any nephrotoxicity*. Free Radic Res, 2014. **48**(10): p. 1218-31.
22. Usuda, K., et al., *Urinary biomarkers monitoring for experimental fluoride nephrotoxicity*. Arch Toxicol, 1998. **72**(2): p. 104-9.
23. Zamora, M.L., et al., *Uranium in drinking water: renal effects of long-term ingestion by an aboriginal community*. Arch Environ Occup Health, 2009. **64**(4): p. 228-41.
24. Zamora, M.L., et al., *Chronic ingestion of uranium in drinking water: a study of kidney bioeffects in humans*. Toxicol Sci, 1998. **43**(1): p. 68-77.
25. Wasana, H.M., et al., *Drinking water quality and chronic kidney disease of unknown etiology (CKDu): synergic effects of fluoride, cadmium and hardness of water*. Environ Geochem Health, 2016. **38**(1): p. 157-68.
26. Lantz, O., et al., *Fluoride-induced chronic renal failure*. Am J Kidney Dis, 1987. **10**(2): p. 136-9.
27. Kurttio, P., et al., *Kidney toxicity of ingested uranium from drinking water*. Am J Kidney Dis, 2006. **47**(6): p. 972-82.
28. Kurttio, P., et al., *Renal effects of uranium in drinking water*. Environ Health Perspect, 2002. **110**(4): p. 337-42.
29. Jimenez-Cordova, M.I., et al., *Evaluation of kidney injury biomarkers in an adult Mexican population environmentally exposed to fluoride and low arsenic levels*. Toxicol Appl Pharmacol, 2018. **352**: p. 97-106.
30. Jayasekara, K.B., et al., *Epidemiology of chronic kidney disease, with special emphasis on chronic kidney disease of uncertain etiology, in the north central region of Sri Lanka*. J Epidemiol, 2015. **25**(4): p. 275-80.
31. Birkner, E., et al., *Disturbance of protein metabolism in rats after acute poisoning with sodium fluoride*. Fluoride, 2000. **33**(4): p. 182-186.
32. Bontemps, A., et al., *In Vivo Comparison of the Phenotypic Aspects and Molecular Mechanisms of Two Nephrotoxic Agents, Sodium Fluoride and Uranyl Nitrate*. Int J Environ Res Public Health, 2019. **16**(7).
33. Dote, T., et al., *Toxicokinetics of intravenous fluoride in rats with renal damage caused by high-dose fluoride exposure*. Int Arch Occup Environ Health, 2000. **73** Suppl: p. S90-2.



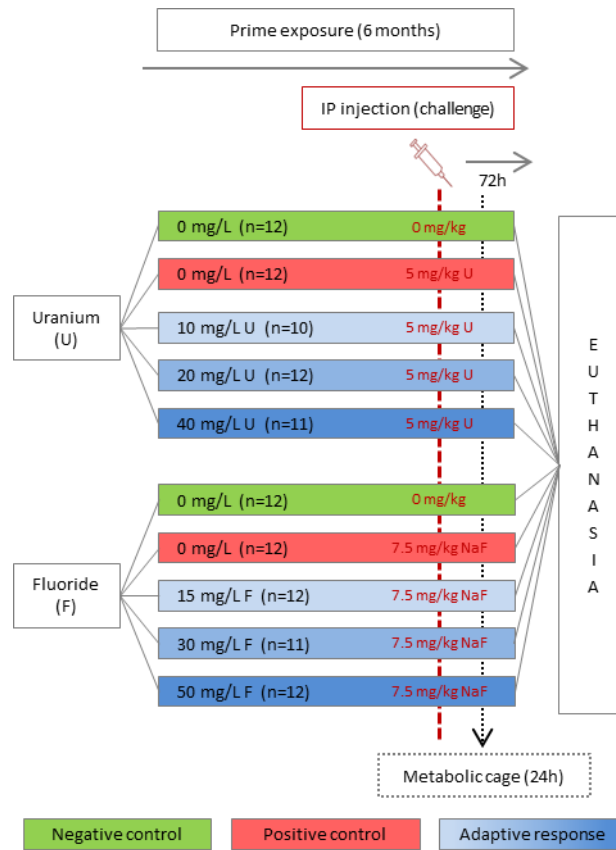
34. Kathren, R.L. and R.K. Burklin, *Acute chemical toxicity of uranium*. Health Phys, 2008. **94**(2): p. 170-9.
35. Sangeetha Vijayan, P., et al., *Biochemical and histopathological responses of the Swiss albino mice treated with uranyl nitrate and its recovery*. Ren Fail, 2016. **38**(5): p. 770-5.
36. Santoyo-Sanchez, M.P., et al., *Effects of acute sodium fluoride exposure on kidney function, water homeostasis, and renal handling of calcium and inorganic phosphate*. Biol Trace Elem Res, 2013. **152**(3): p. 367-72.
37. Shashi, A., J. Singh, and S. Thapar, *Toxic effects of fluoride on rabbit kidney*. Fluoride, 2002. **35**: p. 38-50.
38. Taylor, J.M., et al., *Toxic effects of fluoride on the rat kidney. I. Acute injury from single large doses*. Toxicol Appl Pharmacol, 1961. **3**: p. 278-89.
39. Domingo, J.L., et al., *Acute toxicity of uranium in rats and mice*. Bull Environ Contam Toxicol, 1987. **39**(1): p. 168-74.
40. Gueguen, Y. and C. Rouas, *Données nouvelles sur la néphrotoxicité de l'uranium*. Radioprotection, 2012. **47**(3): p. 345-359.
41. Leggett, R.W., *The behavior and chemical toxicity of U in the kidney: a reassessment*. Health Phys, 1989. **57**(3): p. 365-383.
42. Gilman, A.P., et al., *Uranyl nitrate: 28-day and 91-day toxicity studies in the Sprague-Dawley rat*. Toxicol Sci, 1998. **41**(1): p. 117-28.
43. Sun, Y., et al., *Acquired resistance to rechallenge injury in rats recovered from subclinical renal damage with uranyl acetate--Importance of proliferative activity of tubular cells*. Toxicol Appl Pharmacol, 2010. **243**(1): p. 104-10.
44. Gueguen, Y., et al., *Low-concentration uranium enters the HepG2 cell nucleus rapidly and induces cell stress response*. Toxicol In Vitro, 2015. **30**(1 Pt B): p. 552-60.
45. Iwakura, T., et al., *Acquired resistance to rechallenge injury after acute kidney injury in rats is associated with cell cycle arrest in proximal tubule cells*. Am J Physiol Renal Physiol, 2016. **310**(9): p. F872-84.
46. Gueguen, Y., et al., *Molecular, cellular, and tissue impact of depleted uranium on xenobiotic-metabolizing enzymes*. Arch Toxicol, 2014. **88**(2): p. 227-39.
47. Cardenas-Gonzalez, M.C., et al., *Proximal renal tubular injury in rats sub-chronically exposed to low fluoride concentrations*. Toxicol Appl Pharmacol, 2013. **272**(3): p. 888-94.
48. Long, Y.G., et al., *Chronic fluoride toxicity decreases the number of nicotinic acetylcholine receptors in rat brain*. Neurotoxicol Teratol, 2002. **24**(6): p. 751-7.
49. Shivarajashankara, Y.M., et al., *Lipid peroxidation and antioxidant systems in the blood of young rats subjected to chronic fluoride toxicity*. Indian J Exp Biol, 2003. **41**(8): p. 857-60.
50. Shivashankara, A.R., et al., *Lipid peroxidation and antioxidant defense systems in liver of rats in chronic fluoride toxicity*. Bull Environ Contam Toxicol, 2002. **68**(4): p. 612-6.
51. Cardenas-Gonzalez, M., et al., *Sub-chronic exposure to fluoride impacts the response to a subsequent nephrotoxic treatment with gentamicin*. J Appl Toxicol, 2016. **36**(2): p. 309-19.
52. Lagarde, F., et al., *Non-monotonic dose-response relationships and endocrine disruptors: a qualitative method of assessment*. Environ Health, 2015. **14**: p. 13.
53. Feinendegen, L.E., A.L. Brooks, and W.F. Morgan, *Biological consequences and health risks of low-level exposure to ionizing radiation: commentary on the workshop*. Health Phys, 2011. **100**(3): p. 247-59.
54. Matsumoto, H., et al., *Vanguards of paradigm shift in radiation biology: radiation-induced adaptive and bystander responses*. J Radiat Res, 2007. **48**(2): p. 97-106.
55. Olivieri, G., J. Bodycote, and S. Wolff, *Adaptive response of human lymphocytes to low concentrations of radioactive thymidine*. Science, 1984. **223**(4636): p. 594-7.
56. Gueguen, Y., A. Bontemps, and T.G. Ebrahimian, *Adaptive responses to low doses of radiation or chemicals: their cellular and molecular mechanisms*. Cell Mol Life Sci, 2019. **76**(7): p. 1255-1273.





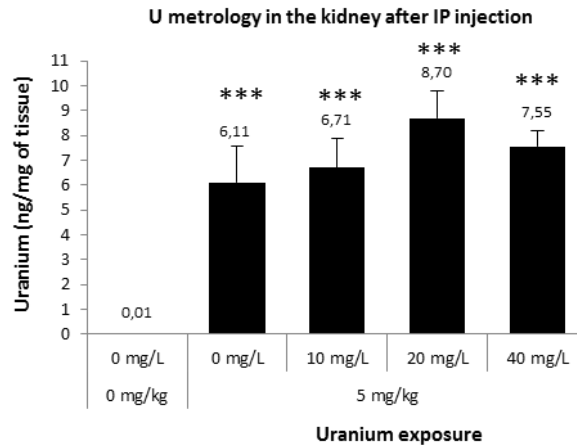
57. Calabrese, E.J. and L.A. Baldwin, *The frequency of U-shaped dose responses in the toxicological literature*. *Toxicol Sci*, 2001. **62**(2): p. 330-8.
58. Calabrese, E.J., *Hormetic mechanisms*. *Crit Rev Toxicol*, 2013. **43**(7): p. 580-606.
59. Andreato, K., M. Leroux, and A. Bouharrou, *Health and cellular impacts of air pollutants: from cytoprotection to cytotoxicity*. *Biochem Res Int*, 2012. **2012**: p. 493894.
60. Calabrese, E.J. and L.A. Baldwin, *Hormesis: the dose-response revolution*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2003. **43**: p. 175-97.
61. Tubiana, M., et al., *The linear no-threshold relationship is inconsistent with radiation biologic and experimental data*. *Radiology*, 2009. **251**(1): p. 13-22.
62. Zimmerman, K.L., et al., *Temporal clinical chemistry and microscopic renal effects following acute uranyl acetate exposure*. *Toxicol Pathol*, 2007. **35**(7): p. 1000-9.
63. Rouas, C., et al., *Effect of nephrotoxic treatment with gentamicin on rats chronically exposed to uranium*. *Toxicology*, 2011. **279**(1-3): p. 27-35.
64. Emeigh Hart, S.G., *Assessment of renal injury in vivo*. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2005. **52**: p. 30-45.
65. Gueguen, Y., C. Rouas, and F.A. Leblond, *Les biomarqueurs d'atteinte rénale*. *Néphrologie et Thérapeutique*, 2012. **8**: p. 146-155.
66. Hidaka, S., et al., *Urinary clusterin levels in the rat correlate with the severity of tubular damage and may help to differentiate between glomerular and tubular injuries*. *Cell Tissue Res*, 2002. **310**(3): p. 289-96.
67. Ichimura, T., et al., *Kidney injury molecule-1: a tissue and urinary biomarker for nephrotoxicant-induced renal injury*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2004. **286**(3): p. F552-63.
68. Tanida, I., T. Ueno, and E. Kominami, *LC3 and Autophagy*. *Methods Mol Biol*, 2008. **445**: p. 77-88.
69. Tapio, S. and V. Jacob, *Radioadaptive response revisited*. *Radiat Environ Biophys*, 2007. **46**(1): p. 1-12.
70. Dublineau, I., et al., *Unexpected lack of deleterious effects of uranium on physiological systems following a chronic oral intake in adult rat*. *Biomed Res Int*, 2014. **2014**: p. 181989.
71. Kobayashi, C.A., et al., *Proteomic analysis of kidney in rats chronically exposed to fluoride*. *Chem Biol Interact*, 2009. **180**(2): p. 305-11.
72. Kroemer, G., G. Marino, and B. Levine, *Autophagy and the integrated stress response*. *Mol Cell*, 2010. **40**(2): p. 280-93.
73. Pierrefite-Carle, V., et al., *Effect of natural uranium on the UMR-106 osteoblastic cell line: impairment of the autophagic process as an underlying mechanism of uranium toxicity*. *Arch Toxicol*, 2016.
74. Schroder, M., *The unfolded protein response*. *Mol Biotechnol*, 2006. **34**(2): p. 279-90.
75. Szumiel, I., *Radiation hormesis: Autophagy and other cellular mechanisms*. *Int J Radiat Biol*, 2012. **88**(9): p. 619-28.
76. Hurault, L., et al., *Uranium Effect on Osteocytic Cells In Vitro*. *Toxicol Sci*, 2019. **170**(1): p. 199-209.
77. Liu, W.J., et al., *Autophagy activation reduces renal tubular injury induced by urinary proteins*. *Autophagy*, 2014. **10**(2): p. 243-56.
78. Dublineau, I., et al., *Modifications of inflammatory pathways in rat intestine following chronic ingestion of depleted uranium*. *Toxicol Sci*, 2007. **98**(2): p. 458-68.
79. Nair, A.R., et al., *Glutathione and mitochondria determine acute defense responses and adaptive processes in cadmium-induced oxidative stress and toxicity of the kidney*. *Arch Toxicol*, 2015. **89**(12): p. 2273-89.
80. Liu, J., W. Qu, and M.B. Kadiiska, *Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2009. **238**(3): p. 209-14.
81. Zhao, Y., et al., *Fluoride induces apoptosis and autophagy through the IL-17 signaling pathway in mice hepatocytes*. *Arch Toxicol*, 2018. **92**(11): p. 3277-3289.





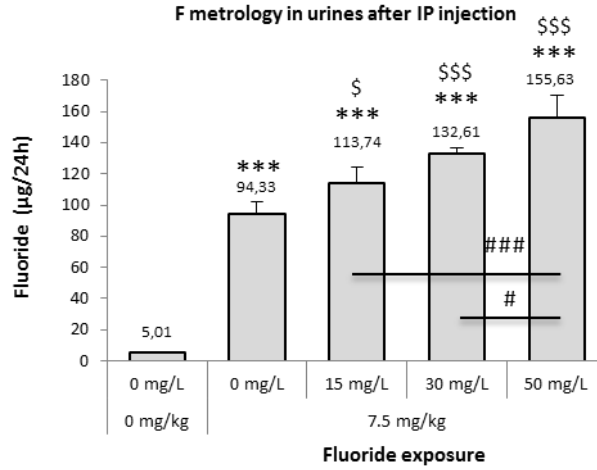
**Figure 1.** General scheme for the distribution of mice in uranium and fluoride groups and the doses administered.





**Figure 2.** U metrology in the kidney of mice drinking contaminated water for 6 months (0, 10, 20, 40 mg/L U) and injected with an acute treatment of 5 mg/kg U or NaCl. The results are presented as the mean  $\pm$  standard error of the mean. The asterisk represents a significant difference with the negative control group (\*\*\*)  $p < 0.001$ ).

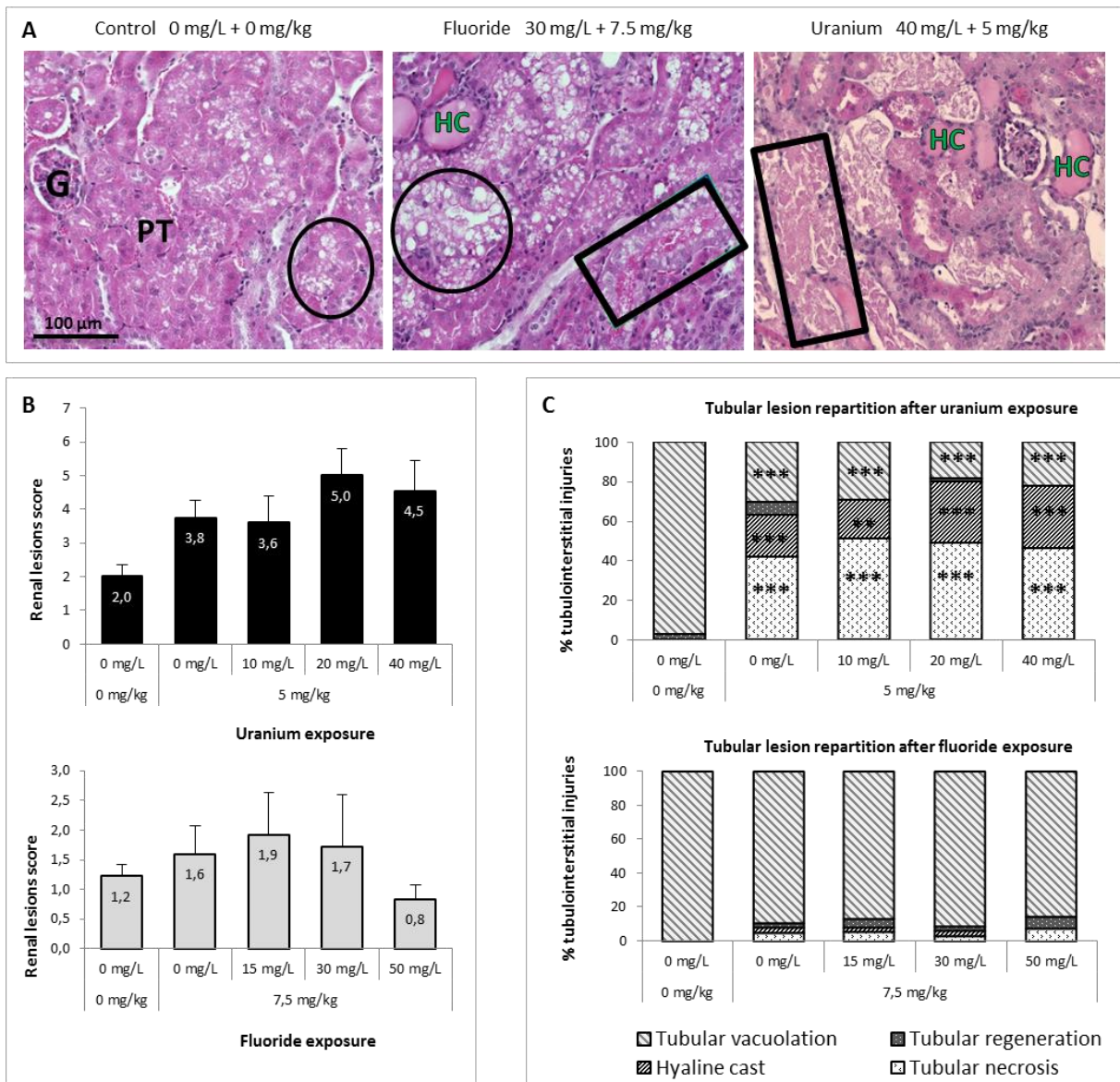




**Figure 3.** F metrology in urines of mice drinking contaminated water for 6 months (0, 15, 30, 50 mg/L F) and injected with an acute treatment of 7.5 mg/kg NaF or NaCl. The results are presented as the mean  $\pm$  standard error of the mean. The asterisk represents a significant difference with the negative control group (0 mg/L + 0 mg/kg), and the dollar symbol represents a significant difference with the positive control group (0 mg/L + 7.5 mg/kg). The number of symbols (1, 2, or 3) corresponds respectively to the level of significance  $p < 0.05$ ,  $p < 0.005$ , and  $p < 0.001$ .

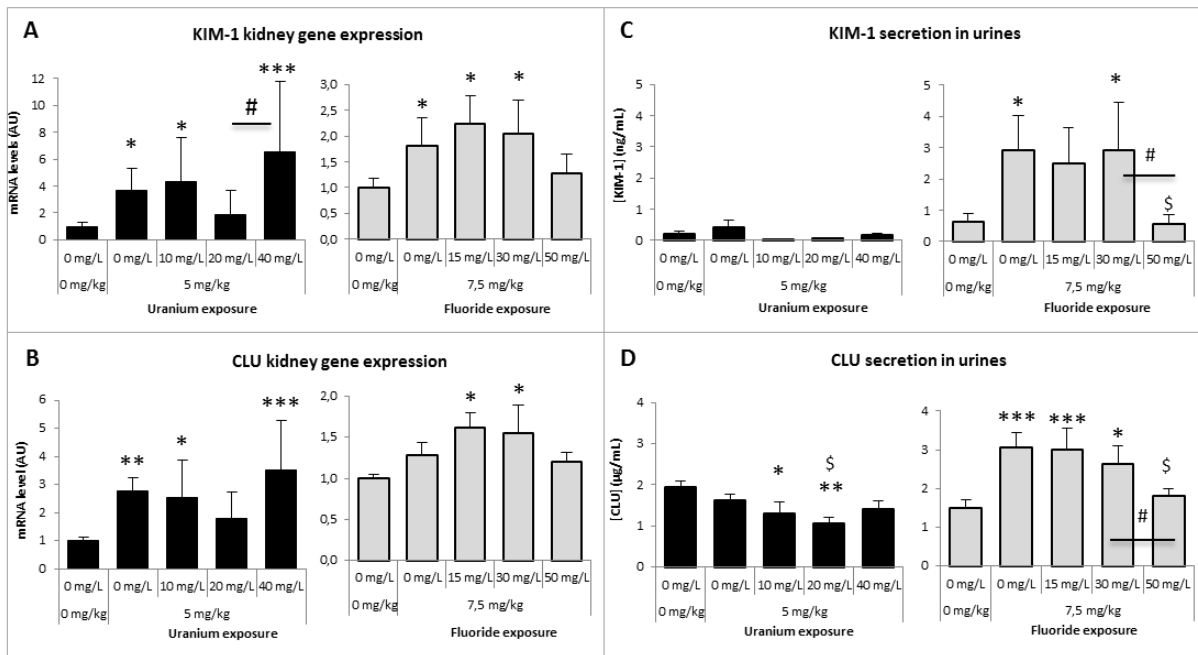






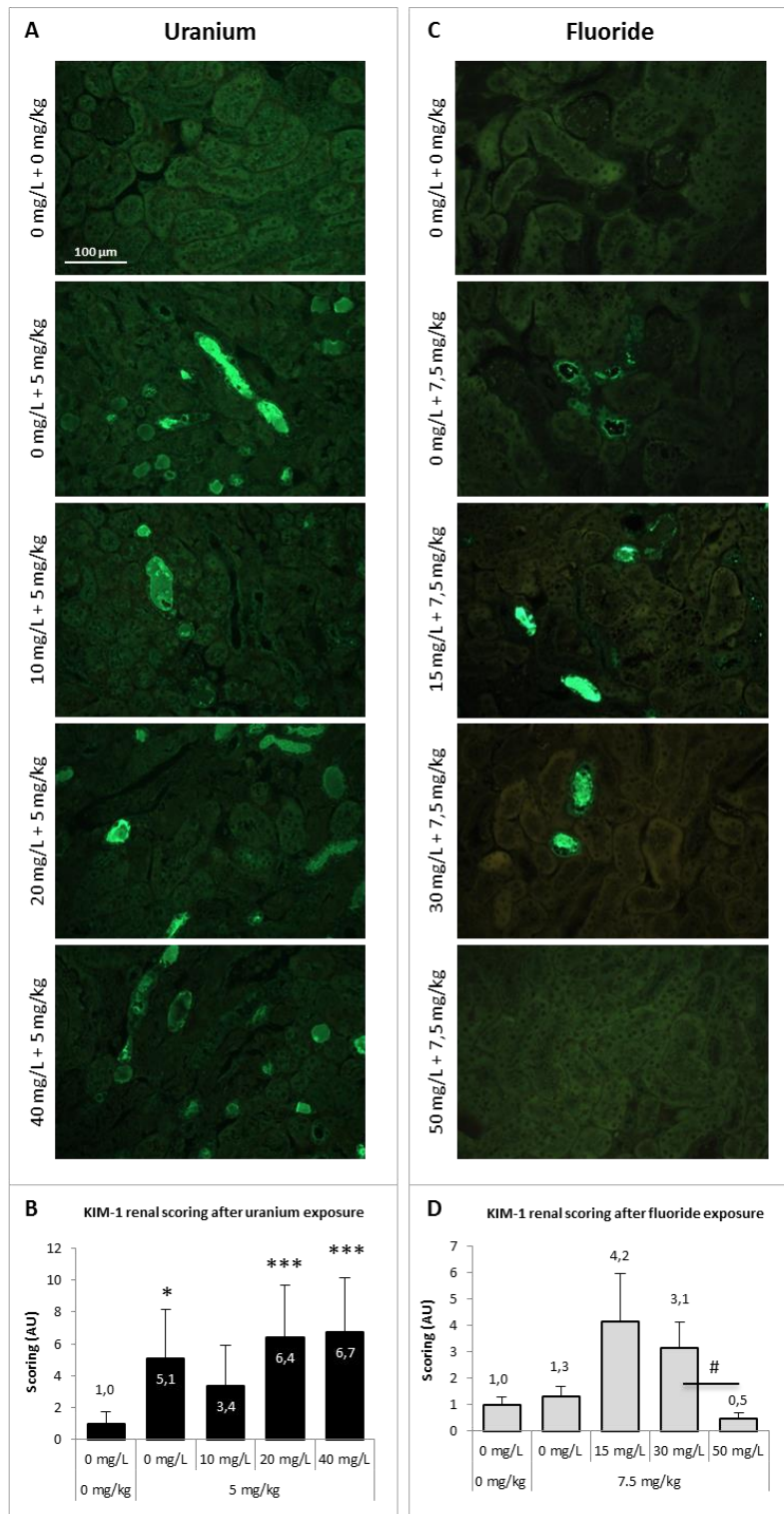
**Figure 4.** Representative photomicrographs (A) (200x) of noticeable renal lesions after HES staining in control mice, U contaminated mice (40 mg/L and 5 mg/kg U) and F contaminated mice (30 mg/L F and 7.5 mg/kg NaF). The letter G, PT, and HC indicate glomeruli, proximal tubules, and hyaline casts, respectively. Tubular vacuolization is indicated by black circles, whereas tubular necrosis is indicated by black rectangles. The renal lesion scores (B) are presented as the mean  $\pm$  standard error of the mean. The percentage of tubular and interstitial injuries (basophilic tubules, tubular necrosis, vacuolization and hyaline casts) in kidneys 72 hours after IP injection (C) is presented as the mean. The asterisk represents a significant difference with the negative control group (0 mg/L + 0 mg/kg) (Two-Way ANOVA with Holm-Sidak correction, \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.005, and \*\*\* $p$ <0.001).





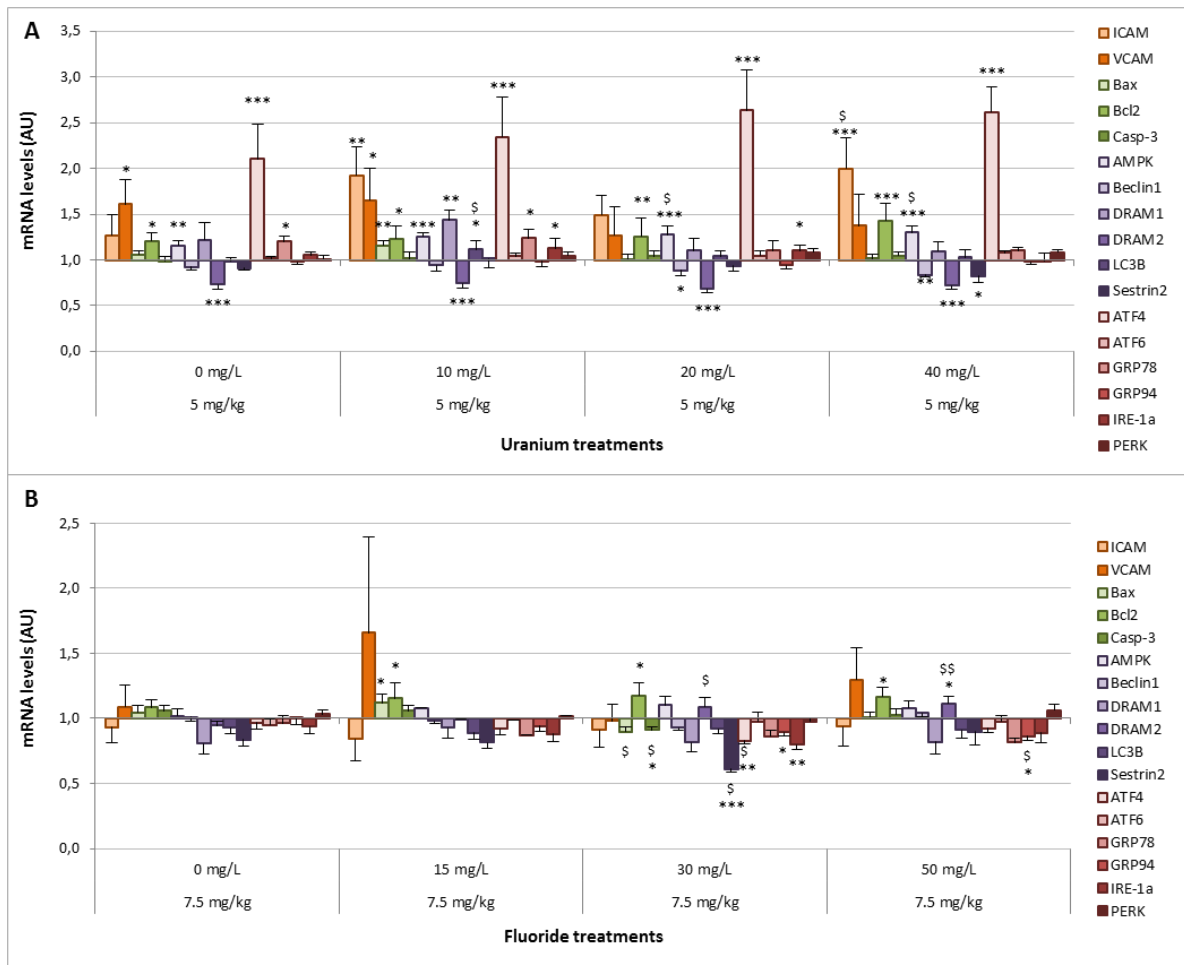
**Figure 5.** Gene expressions of sensitive nephrotoxicity markers KIM-1 and CLU in the renal cortex 72 hours after the IP injection (A-B) and their urinary protein levels found directly after IP injection. Mice were chronically exposed during 6 months, by drinking contaminated water (0, 10, 20, 40 mg/L U or 0, 15, 30, 50 mg/L F) and then injected with an acute treatment of either NaCl, 5 mg/kg U or 7.5 mg/kg NaF. The results are presented as the mean  $\pm$  standard error of the mean. The asterisk represents a significant difference with the negative control group (0 mg/L + 0 mg/kg), and the dollar symbol represents a significant difference with the positive control group (0 mg/L + 5 mg/kg for U and 0 mg/L + 7.5 mg/kg for F). The number of symbols (1, 2, or 3) corresponds respectively to the level of significance  $p < 0.05$ ,  $p < 0.005$ , and  $p < 0.001$ .





**Figure 6.** Representative photomicrographs (200x) of the protein KIM-1 renal expression (in green), *in situ*, of mice chronically exposed during 6 months, by drinking contaminated water (0, 10, 20, 40 mg/L U or 0, 15, 30, 50 mg/L F) and then injected with an acute treatment of either NaCl, 5 mg/kg U or 7.5 mg/kg NaF (**A; C**). The results of the semi-quantification of KIM-1 scoring (**B; D**) are presented as the mean  $\pm$  standard error of the mean. The asterisk represents a significant difference with the negative control group (0 mg/L + 0 mg/kg). The number of symbols (1, 2, or 3) corresponds respectively to the level of significance  $p < 0.05$ ,  $p < 0.005$ , and  $p < 0.001$  (general estimating equation for normal regression).

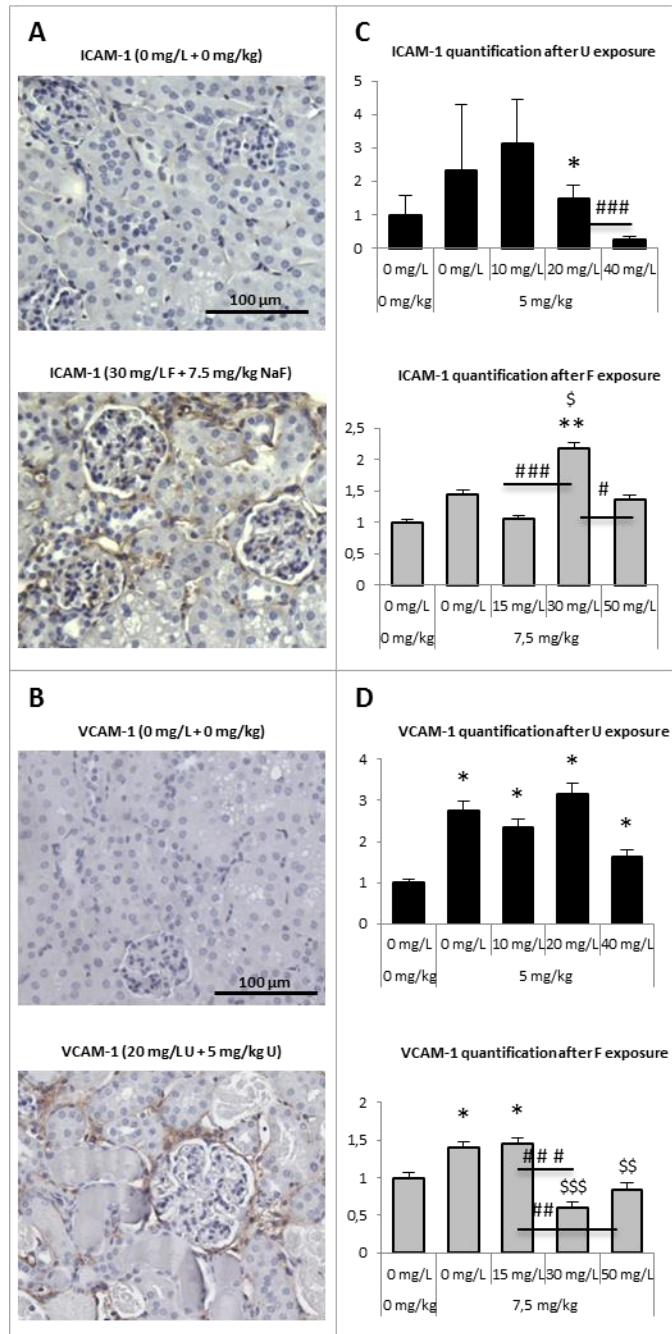




**Figure 7.** Gene expressions of molecules implied in inflammation (in orange), apoptosis (in green), autophagy (in purple), and the UPR (in red), in the renal cortex 72 hours after the IP injection of mice chronically exposed to U (**A**) and F (**B**). Mice were exposed during 6 months, by drinking contaminated water (0, 10, 20, 40 mg/L U or 0, 15, 30, 50 mg/L F) and then injected with an acute treatment of either NaCl, 5 mg/kg U or 7.5 mg/kg NaF. The results are presented relatively to the control group, as the mean  $\pm$  standard error of the mean. The asterisk represents a significant difference with the negative control group (0 mg/L + 0 mg/kg), and the dollar symbol represents a significant difference with the positive control group (0 mg/L + 5 mg/kg for U and 0 mg/L + 7.5 mg/kg for F). The number of symbols (1, 2, or 3) corresponds respectively to the level of significance  $p < 0.05$ ,  $p < 0.005$ , and  $p < 0.001$ .

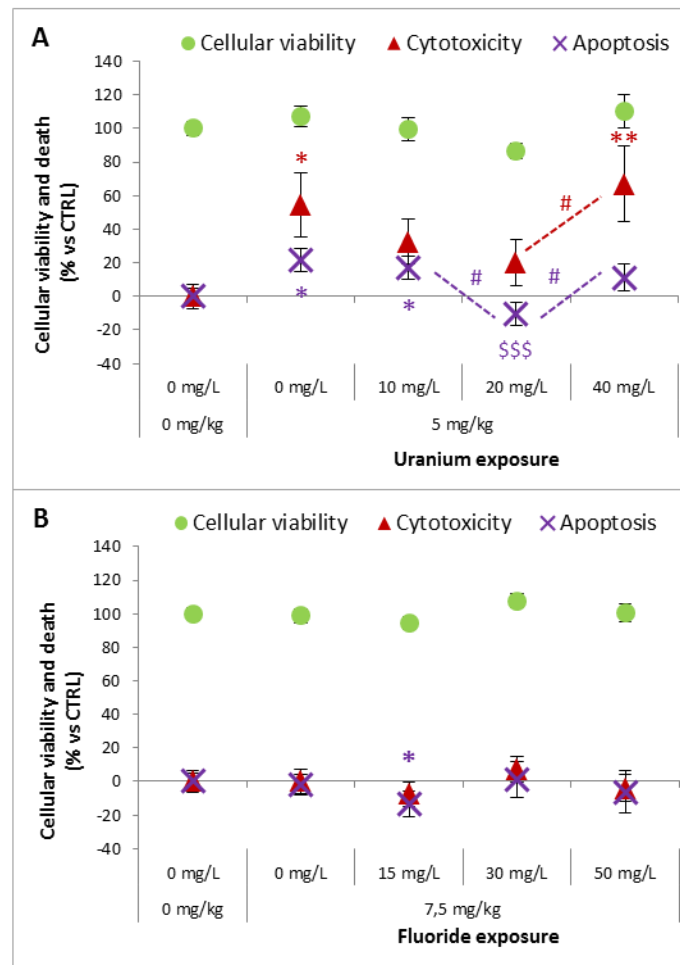






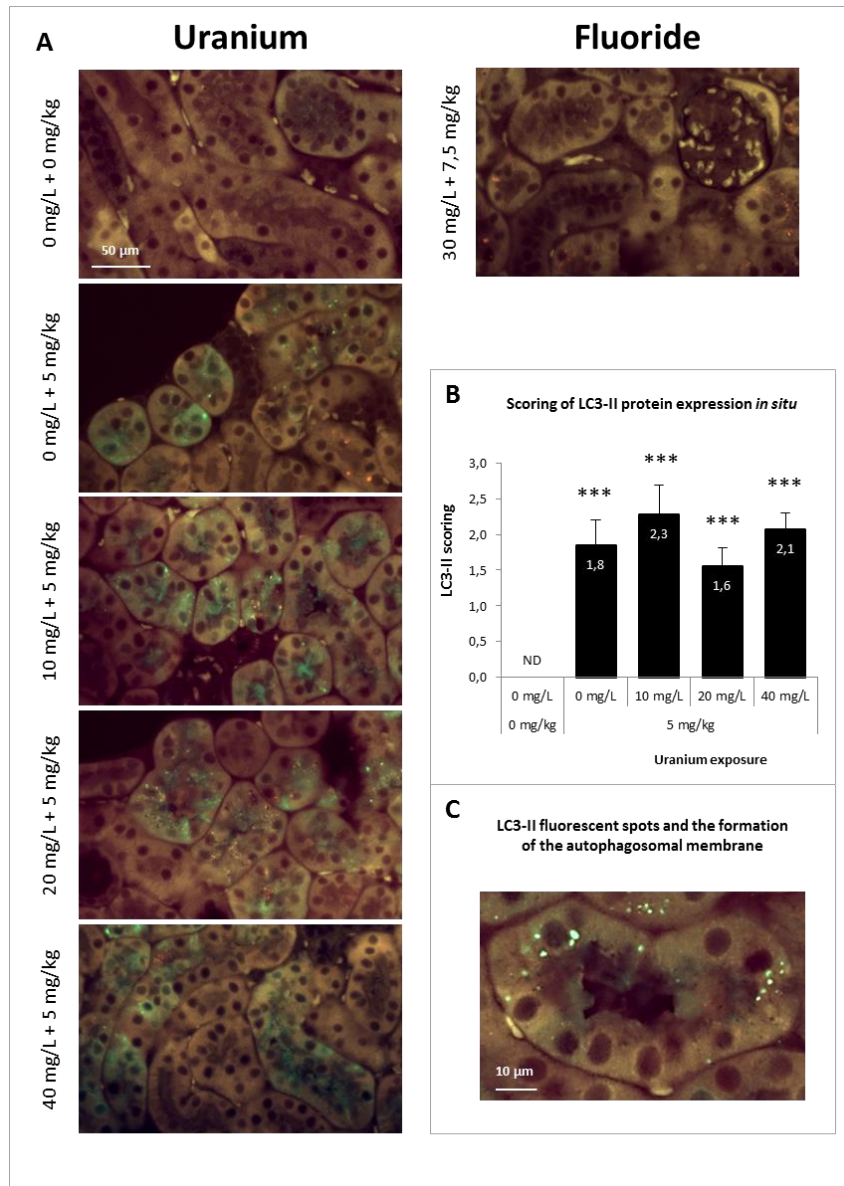
**Figure 8.** Representative photomicrographs of the proteins ICAM-1 (A) and VCAM-1 (B) renal expression, *in situ*, of non-exposed and chronically exposed mice (0 and 30 mg/L F or 0 and 20 mg/L U) before challenge injection (0 and 7.5 mg/kg NaF, or 0 and 5 mg/kg U). The results of the automatic quantification of ICAM-1 (C) and VCAM-1 (D) are presented as the mean  $\pm$  standard error of the mean. The asterisk represents a significant difference with the negative control group (0 mg/L + 0 mg/kg), and the dollar symbol represents a significant difference with the positive control group (0 mg/L + 5 mg/kg for U and 0 mg/L + 7.5 mg/kg for F). The number of symbols (1, 2, or 3) corresponds respectively to the level of significance  $p < 0.05$ ,  $p < 0.005$ , and  $p < 0.001$  (general estimating equation for normal regression).





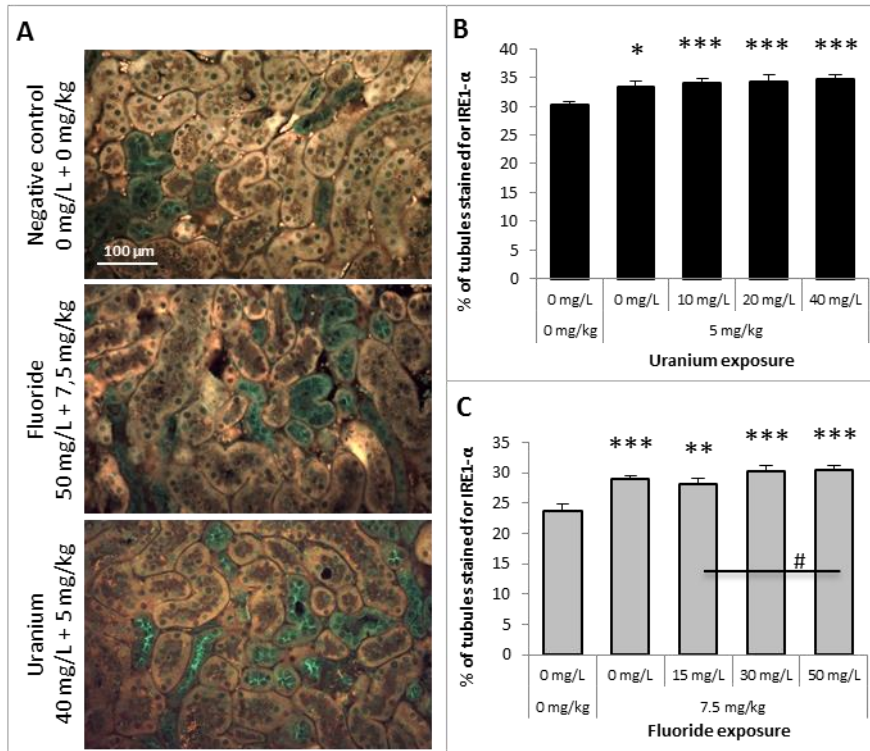
**Figure 9.** Cellular viability, cytotoxicity and caspase 3/7 activity in the renal cortex of mice 72 hours after U and F IP injections. Mice were chronically exposed during 6 months, by drinking contaminated water (0, 10, 20, 40 mg/L U or 0, 15, 30, 50 mg/L F) and then injected with an acute treatment of either NaCl, 5 mg/kg U or 7.5 mg/kg NaF. The results are presented as the mean, in percentage versus the negative control group  $\pm$  standard error of the mean. The asterisk represents a significant difference with the negative control group (0 mg/L + 0 mg/kg), and the dollar symbol represents a significant difference with the positive control group (0 mg/L + 5 mg/kg for U and 0 mg/L + 7.5 mg/kg for F). The number of symbols (1, 2, or 3) corresponds respectively to the level of significance  $p < 0.05$ ,  $p < 0.005$ , and  $p < 0.001$ .





**Figure 10.** Representative photomicrographs (400x) of the protein LC3-II renal expression (in green), *in situ*, of mice chronically exposed during 6 months, by drinking contaminated water (0, 10, 20, 40 mg/L U or 30 mg/L F) and then injected with an acute treatment of either NaCl, 5 mg/kg U or 7.5 mg/kg NaF (A). The results of the semi-quantification of LC3B scoring after U exposure (B) are presented as the mean  $\pm$  standard error of the mean. The asterisk represents a significant difference with the negative control group (0 mg/L + 0 mg/kg) (general estimating equation for normal regression,  $***p < 0.001$ ). A photographic enlargement is presented (C) after an exposure to 40 mg/L and 5 mg/kg U to see the green spots of LC3-II, showing the protein recruitment to form autophosomes membranes.





**Figure 11.** Representative photomicrographs (200x) of the protein IRE1- $\alpha$  renal expression (in green), *in situ*, of control mice and mice exposed during a 6-month period with either 50 mg/L F or 40 mg/L U in drinking water, and then injected with an acute treatment of 7.5 mg/kg F or 5 mg/kg U, respectively (A). The results of the counting of IRE1- $\alpha$  positive tubules after U (B) or F exposures (C) are presented as the mean  $\pm$  standard error of the mean. The asterisk represents a significant difference with the negative control group (0 mg/L + 0 mg/kg) (general estimating equation for normal regression, \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.005, and \*\*\* $p$ <0.001).





### C. Conclusion

Du fait de l'absence de néphrotoxicité lors d'une contamination chronique à l'uranium ; de nombreuses études précédentes soupçonnaient la mise en place d'une réponse adaptative, sans jamais parvenir à le démontrer (Dublineau et al. 2014; Gueguen et al. 2014; Poisson et al. 2014). Nos résultats, obtenus au niveau génique, protéique et *in situ*, ont permis d'identifier la mise en place d'une réponse adaptative aux doses respectives de 20 et 50 mg/L d'uranium et de fluor. Dans le cas du fluor, une réponse adaptative avait également été observée lors d'une exposition chronique à la même concentration de fluor (50 mg/L) précédant un traitement néphrotoxique à la gentamicine (Cardenas-Gonzalez et al. 2016). Durant cette étude les auteurs ont émis l'hypothèse que la réponse adaptative observée résulterait de la diminution d'accumulation de la gentamicine dans le rein induite par le fluor et de l'induction de facteurs cytoprotecteurs. Nos résultats confirment la présence d'une réponse adaptative à cette concentration, tout en démontrant que les mécanismes adaptatifs induits par le fluor sont plus variés.

Différents mécanismes ont été évalués durant cette étude, dont l'apoptose, l'inflammation, l'autophagie, la réponse UPR et le stress oxydatif. À notre connaissance, nous sommes les premiers à avoir mis en évidence l'induction de la réponse UPR dans le rein après une exposition à l'uranium ou au fluor chez le rongeur. Mais du fait que ce mécanisme soit induit chez les animaux pré-exposés ou non, nous ne pouvons pas conclure quant à son éventuelle implication dans la réponse adaptative mise en place. De manière similaire, nous ne pouvons pas conclure quant à l'implication de l'autophagie dans la réponse adaptative mise en place après contamination à l'uranium, mais nous sommes à notre connaissance, les premiers à ce jour à avoir montré son induction dans le rein par ce radionucléide. Une diminution de l'activité apoptotique et une diminution de l'inflammation ont respectivement été mises en évidence dans la réponse adaptative à l'uranium et au fluor. Étant donné que l'apoptose est un mécanisme induit par une activation prolongée de la réponse UPR et de l'autophagie, on peut supposer qu'il existe une interaction entre ces trois mécanismes et que les effets anti-apoptotiques observés à 20 mg/L d'uranium seraient probablement dépassés après un délai plus long d'exposition. De manière similaire, l'inflammation est un mécanisme très complexe dans lequel de nombreux facteurs peuvent faire varier la balance pro-/anti-inflammatoire et jouant un rôle crucial dans l'homéostasie cellulaire. La diminution du recrutement de cellules inflammatoires peut être bénéfique à court terme, mais sur un plus long terme il se peut qu'une inhibition prolongée de l'inflammation puisse être délétère pour l'organe.

Les études géniques que nous avons effectuées n'ont pas laissé supposer une induction des voies antioxydantes après une exposition à l'uranium. En revanche, il se pourrait que ces voies soient induites lors d'une contamination chronique au fluor, comme l'indiquent les augmentations des expressions de Nrf2 et de GSTA1 dans le groupe présentant la mise en place d'une réponse adaptative. La réponse antioxydante ayant déjà été mise en évidence en réponse au fluor dans certaines études (Chattopadhyay et al. 2011; Mukhopadhyay and Chattopadhyay 2014; Mukhopadhyay et al. 2015a; Mukhopadhyay et al. 2015b), il serait intéressant d'étudier plus en détail ce mécanisme adaptatif.



### III. Résultats préliminaires obtenus *in vitro* suite à une exposition à l'uranium ou au fluor

Durant cette thèse, des études *in vitro* ont été initiées, dans le but de pouvoir étudier les voies de signalisation impliquées dans la réponse adaptative rénale à de faibles doses d'uranium et de fluor.

Pour ce faire, le modèle HK-2 a été utilisé, des cellules épithéliales rénales humaines issues de TCP. Ces cellules possèdent un phénotype de cellules de TCP bien différenciées, exprimant notamment la PAL, la GGT et l'AP (Ryan et al. 1994). Cette lignée cellulaire est un modèle bien connu du laboratoire et utilisé lors de nombreuses études de toxicologie cellulaire (Gunnness et al. 2010; Sohn et al. 2013), y compris lors d'exposition à l'uranium ou au fluor (Bao et al. 2013; Hao et al. 2014; Zager and Iwata 1997).

Une mise au point a tout d'abord été réalisée sur les tests phénotypiques (mort cellulaire, dosages des enzymes PAL et GGT) et sur la détection des mécanismes biologiques (apoptose, autophagie) induits *in vitro*.

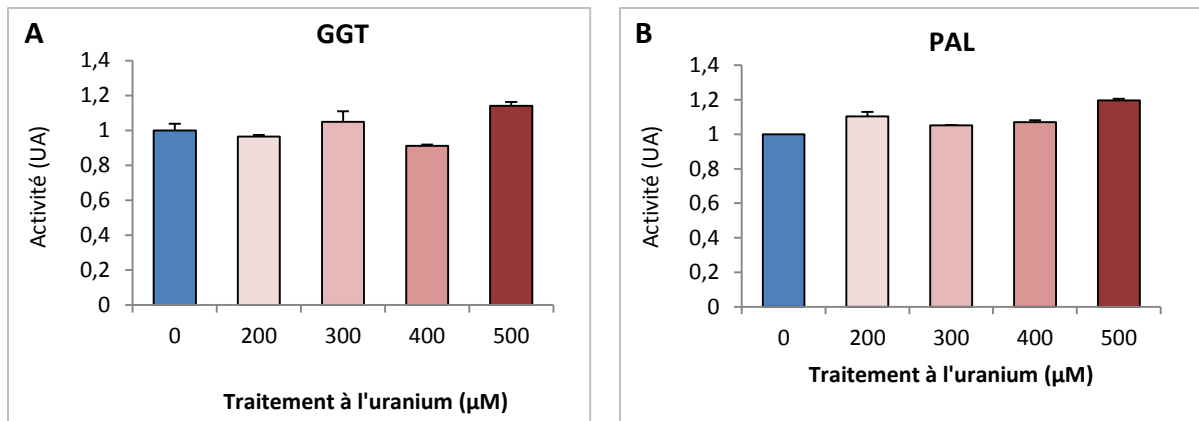
L'objectif était de mettre en place un modèle *in vitro* d'exposition chronique à faibles doses d'uranium ou de fluor suivie d'une dose challenge afin d'étudier les mécanismes de la réponse adaptative. Cependant, nous avons rencontré plusieurs problèmes techniques inattendus (précipités d'uranium qui interfèrent avec les dosages, contamination de la lignée cellulaire, problème de spécificité ou de sensibilité de certains dosages... ) lors de nos expérimentations retardant la mise en place de ce protocole et nous obligeant à prioriser nos recherches sur le modèle *in vivo* durant la période de ces trois années. Néanmoins, afin de valoriser le travail effectué sur le modèle *in vitro*, les résultats obtenus lors de ces mises au point expérimentales sur des cellules traitées de manière aiguë à fortes concentrations sont présentés ci-dessous.

Les concentrations challenge ainsi que la durée d'exposition aiguë de 24 heures ont été choisies afin d'induire une altération phénotypique, sans pour autant observer de mortalité trop importante. La concentration de 500  $\mu\text{M}$  d'uranium a été sélectionnée à partir des résultats expérimentaux obtenus précédemment au laboratoire par Matthieu Benet (stage de licence professionnelle 2016), tandis que la gamme de concentration de fluor (0.5, 1, 1.5 et 2 mM) a été choisie d'après les résultats obtenus par deux étudiants du CINVESTAV, Daniel De Jesus Lopez Ventura et Benjamin Parada De la Cruz.

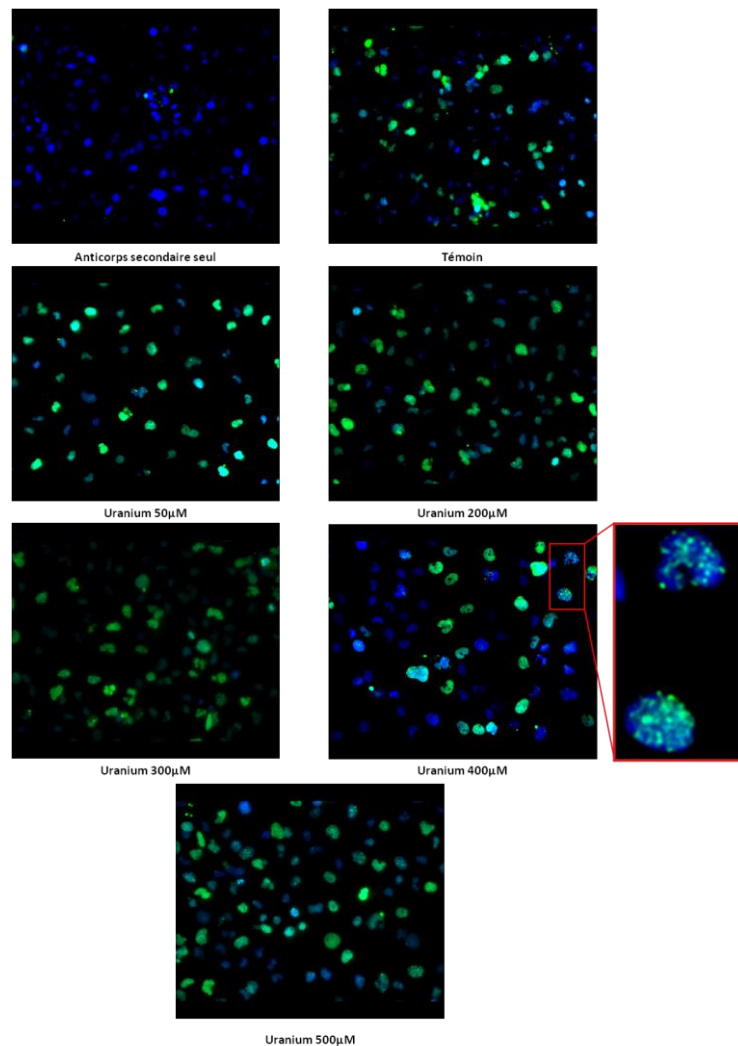
#### A. Tests phénotypiques réalisés après contamination aiguë à l'uranium

La  $\gamma$ -glutamyltransférase (GGT) est une enzyme exprimée dans le rein, et plus précisément dans les cellules des TCP. Son activité augmente dans les cellules en souffrance, servant ainsi de marqueur phénotypique des cellules issues des TCP, que ce soit *in vivo* ou *in vitro* sur des cellules épithéliales rénales, dont la lignée HK-2.

La phosphatase alcaline (PAL) est également une enzyme exprimée dans les cellules rénales, mais à l'inverse la diminution de son activité est corrélée à une altération fonctionnelle et donc à des effets tissulaires délétères. La mesure de son activité dans les cellules HK-2 permet entre autre de connaître l'état de différenciation de nos cellules.



**Figure 44 : Activité des enzymes GGT (A) et PAL (B) dans des cellules HK-2 traitées à l'uranium**  
 Les résultats obtenus pour chaque traitement sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM des duplicats. L'expérience n'ayant été faite qu'une seule fois, aucun test statistique n'a été effectué



**Figure 45 : Immunomarquage de  $\gamma$ -H2AX dans des cellules HK-2 traitées à l'uranium**  
 Les cellules ont été traitées avec différentes concentrations d'uranium (0, 200, 300, 400 et 500  $\mu$ M) durant 24 heures, avant fixation et immunomarquage, puis observées au microscope à fluorescence (200X).

Les premiers tests réalisés sur nos cellules après une exposition de 24 heures à l'uranium n'ont pas laissés supposés que nos traitements aigus (200 à 500  $\mu\text{M}$ ) induiraient une modification phénotypique des activités enzymatiques de GGT et PAL (**figure 44**).

### B. Test d'immunomarquage de $\gamma\text{-H}_2\text{AX}$ après contamination aiguë à l'uranium

Afin d'étudier les dommages à l'ADN potentiellement induits par l'uranium, un test d'immunomarquage de la phosphorylation de l'histone  $\text{H}_2\text{AX}$ , un marqueur des CDB de l'ADN, a été réalisé *in vitro* sur des cellules HK-2 traitées entre 50 et 500  $\mu\text{M}$  pendant 24 heures. Les immunomarquages ont été réalisés sur des Labteck, selon le protocole indiqué dans la partie matériel et méthodes. Lors du retrait des puits en plastique, un reste de joint en silicone demeure, et de ce fait induit des irrégularités sur la lame qui empêchent la mise au point et la lecture automatique effectuée par le logiciel Metacyte-Metafer. Les acquisitions ont donc été faites manuellement, au microscope à fluorescence.

Lors de ce protocole, plusieurs conditions ont été testées, avec 4 dilutions d'anticorps primaire, et 4 dilutions d'anticorps secondaire. Les dilutions de 1/10'000 et de 1/4'000 utilisées respectivement pour les anticorps primaire et secondaire semblent adéquates car les images ne présentent pas de bruit de fond, et montrent une bonne co-localisation entre le DAPI et le marquage de  $\gamma\text{-H}_2\text{AX}$ . Le témoin négatif, marqué avec l'anticorps secondaire seul, ne présente pas de fluorescence. En revanche, la fluorescence est bien détectable lors de l'ajout de l'anticorps primaire en amont dans le groupe témoin (0  $\mu\text{M}$ ).

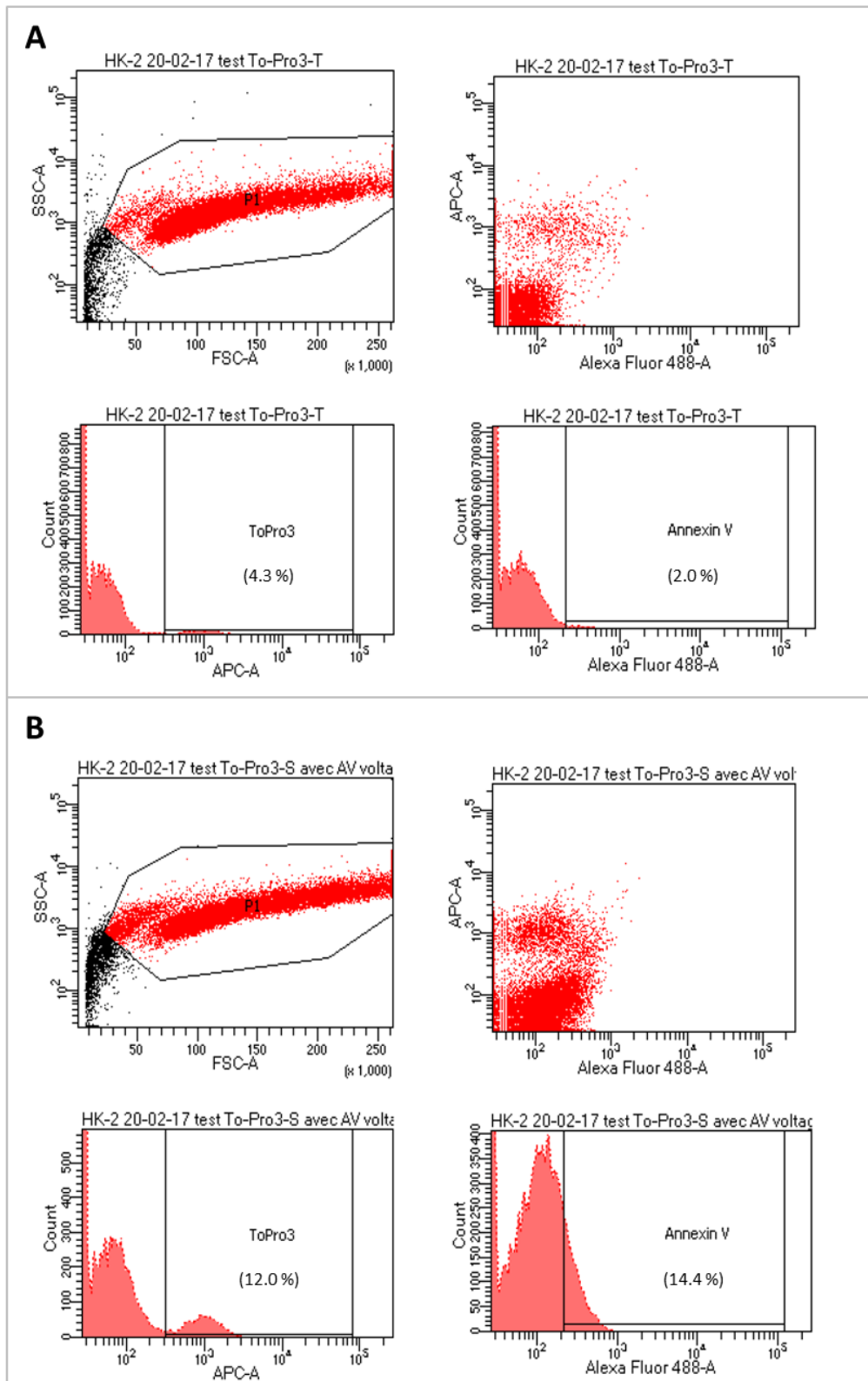
Pour les cellules traitées à l'uranium (50-500  $\mu\text{M}$ ), le taux de noyaux marqués ne semble pas dépendre de la dose de traitement. Certains noyaux sont entièrement marqués, tandis que d'autres montrent la présence de très nombreux foyers, tel que montré dans l'agrandissement du puits traité à 400  $\mu\text{M}$  (**figure 45**).

En conclusion, cet immunomarquage met en évidence l'expression de la protéine  $\gamma\text{-H}_2\text{AX}$  dans les cellules rénales HK-2, mais une quantification des foyers  $\gamma\text{-H}_2\text{AX}$  s'avère difficile dans nos conditions. Compte tenu de cette absence de différence entre les cellules du groupe témoin (0  $\mu\text{M}$ ) et les cellules traitées à l'uranium (50-500  $\mu\text{M}$ ), et du fait de l'aspect chronophage d'une quantification manuelle, nous avons donc décidé de nous consacrer à l'étude d'autres paramètres, impliqués dans la réponse cellulaire à l'uranium et au fluor.

### C. Détection de l'apoptose après une contamination des cellules HK-2 à l'uranium ou au fluor

#### a. Méthode FACS

L'apoptose est l'un des mécanismes cellulaires induits suite à une exposition à l'uranium d'après la littérature. La méthode FACS permet une quantification précise des cellules en apoptose sur différents types cellulaires tels que la lignée HK-2 (Ding et al. 2012; Gu et al. 2016). Afin d'étudier ce mécanisme, nous avons donc essayé de marquer les cellules en apoptose par l'annexine V, avec l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) qui possède un pic d'excitation et d'émission à 495 nm et 521 nm respectivement. Les cellules en nécrose ont également été marquées, soit avec l'iodure de



**Figure 46 : Pourcentage de cellules HK-2 marquées par l'Annexine V et/ou par To-Pro 3 sans traitement (A) ou après 5 heures d'exposition à 0.1  $\mu$ M de staurosporine (B)**

propidium (IdP), le marqueur le plus classiquement utilisé pour identifier les cellules en nécrose par FACS, soit avec To-Pro 3.

Les marquages obtenus grâce à la méthode FACS sont quantifiés de la manière suivante :

- Les cellules vivantes sont IdP (ou ToPro3) négatives et Annexine V négatives
- Les cellules en nécrose sont seulement positives pour le marquage IdP ou ToPro3
- Les cellules en apoptose sont seulement positives pour le marquage Annexine V
- Les cellules en fin d'apoptose / nécrose sont positives pour les deux marquages Annexine V et IdP (ou ToPro3)

Des premiers essais ont été menés avec les marquages Annexine V et IdP. Avant lecture au FACS, différents traitements à l'uranium (200 à 500  $\mu\text{M}$ ) avaient été effectués sur 24 heures, ainsi qu'un traitement pro-apoptotique à la staurosporine sur 5 heures (0.1, 1 et 10  $\mu\text{M}$ ). Les résultats n'ont montré aucune différence entre les sous-populations cellulaires marquées à l'Annexine V ou à l'IdP, et cela quel que soit le traitement (uranium ou staurosporine). Cela pourrait provenir du fait que l'IdP émet dans le spectre de la phycoerythrine (PE), et qu'il existe par conséquent un risque d'overlap entre FITC et PE.

C'est pourquoi nous avons par la suite essayé d'identifier les cellules en nécrose avec le marqueur To-Pro 3. Il est associé à la sonde fluorochrome allophycocyanine et possède un pic d'excitation et d'émission à 650 nm et 660 nm, respectivement. Ce spectre se situe donc loin du pic de FITC et permet d'éviter un « overlap » entre les deux fluorochromes.

Nos résultats, présentés en **figure 46**, montrent que les cellules non traitées ne présentent que très peu de nécrose (4.3%) ou d'apoptose (2.0%), tandis qu'un traitement à la staurosporine de 0.1  $\mu\text{M}$  semble induire une nécrose (12.0%) et une apoptose (14.4%) des cellules HK-2. Cependant, les cellules avaient été observées au microscope avant passage au FACS et une proportion bien supérieure semblait être en apoptose (>50%). De plus, la répartition des cellules marquées par l'Annexine V est censée être divisée en deux pics : l'un représentant le marquage basal des cellules non apoptotique, et le second représentant les cellules positives pour l'Annexine V. On observe effectivement ces deux pics dans le cas du marquage To-Pro 3, mais pas dans le cas du marquage par l'Annexine V. Par conséquent, il se pourrait que notre marquage à l'Annexine V ne convienne pas, probablement du fait d'un problème d'anticorps.

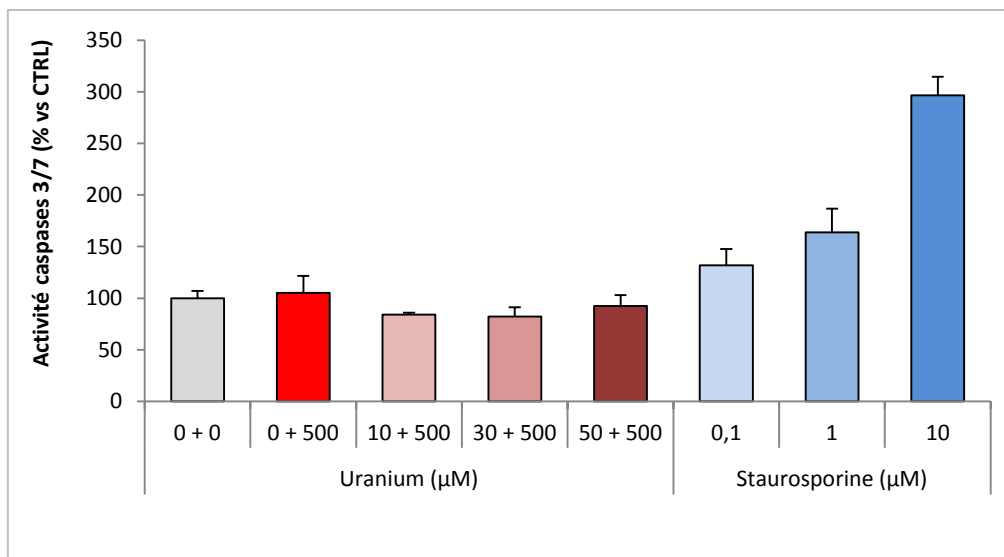
Afin de s'assurer qu'une apoptose est bien induite comme nous le suspectons après observation au microscope, nous avons donc cherché à mesurer l'activité apoptotique des cellules HK-2 par des tests enzymatiques.

### b. Le dosage de l'activité des caspases effectrices 3 et 7

#### *$\alpha$ . Dans le cas d'une exposition chronique à l'uranium*

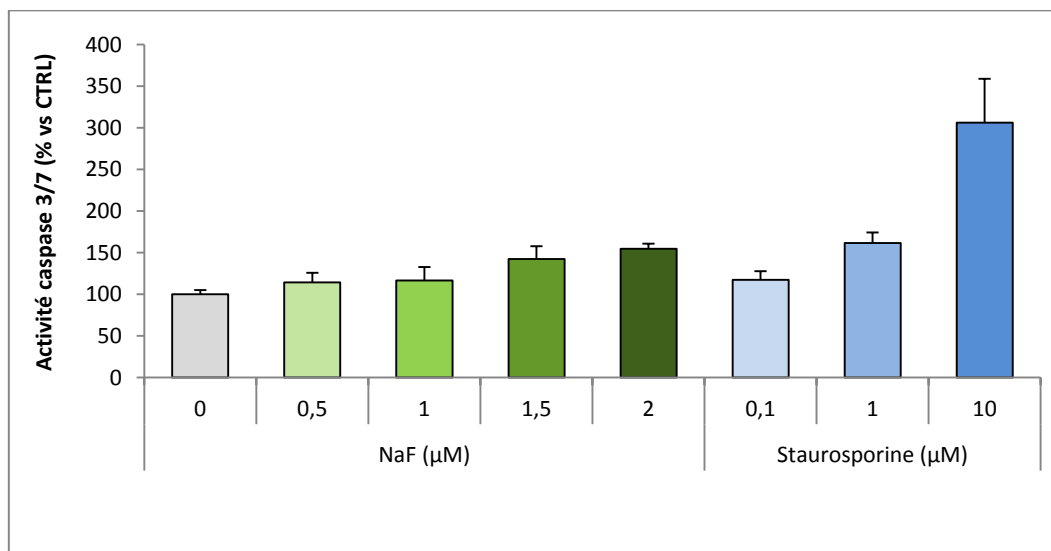
Nous avons mesuré l'activité des caspases 3/7 effectrices de l'apoptose dans nos cellules HK-2 après un protocole spécifique d'exposition prime + challenge. Dans un premier temps, les cellules ont été exposées de manière chronique durant 12 jours à 0, 10, 30 ou 50  $\mu\text{M}$  d'uranium, puis elles ont été





**Figure 47 : Activité des caspases 3/7 dans des cellules HK-2 exposées chroniquement puis de manière aiguë à l'uranium**

Les cellules ont été soit exposées à l'uranium durant 12 jours (0, 10, 30 ou 50 µM) avant d'être traitées 24 heures avec 500 µM d'uranium, soit exposées à la staurosporine (0.1, 1 et 10 µM) durant 5 heures. Les résultats des dosages enzymatiques sont exprimés en % d'induction versus l'activité du groupe témoin, en moyenne ± SEM des duplicats. L'expérience n'ayant été faite qu'une seule fois, aucun test statistique n'a été effectué.



**Figure 48 : Activité des caspases 3/7 dans des cellules HK-2 exposées de manière aiguë au fluor**

Les cellules ont été soit exposées à différentes concentrations de fluor (0, 0.5, 1, 1.5 et 2 mM) durant 24 heures, soit exposées à la staurosporine (0.1, 1 et 10 µM) durant 5 heures. Les résultats des dosages enzymatiques sont exprimés en % d'induction versus l'activité du groupe témoin, en moyenne ± SEM des duplicats. L'expérience n'ayant été faite qu'une seule fois, aucun test statistique n'a été effectué.

traitées à la concentration de 500  $\mu\text{M}$  durant 24 heures, avant que l'activité des caspases ne soit mesurée. Des cellules traitées durant 5 heures à la staurosporine (0.1, 1 et 10  $\mu\text{M}$ ) servent de témoins positifs pour l'induction de l'apoptose.

Les résultats obtenus sont présentés en **figure 47** et montrent que le traitement aigu seul (0 + 500  $\mu\text{M}$ ) ne semble pas induire d'augmentation de l'activité apoptotique dans les cellules HK-2 (activité à 105 % en comparaison avec le groupe témoin). En revanche l'activité des caspases est réduite d'environ 20 % dans le cas d'un pré-traitement avec 10 ou 30  $\mu\text{M}$  d'uranium, ce qui aurait tendance à confirmer les résultats précédemment obtenus au laboratoire qui montraient une augmentation de la prolifération cellulaire dans ces conditions (Master 2, Anne Sophie Garin 2014-2015). Les témoins positifs montrent bien une induction de l'apoptose, avec une activité allant jusqu'à 296 % de celle du groupe témoin dans le cas d'un traitement à 10  $\mu\text{M}$ . Cependant ces résultats n'ayant pas pu être reproduits plusieurs fois, les conclusions tirées de nos résultats ne sont pas statistiquement analysables et doivent être interprétées avec précaution.

En revanche, il est intéressant de noter qu'un traitement à 0.1  $\mu\text{M}$  de staurosporine induit une augmentation d'environ 32 % de l'activité apoptotique dans les cellules, tandis que nous ne détectons que 14.4 % d'apoptose par la méthode FACS, avec le même traitement.

### *$\beta$ . Dans le cas d'une exposition aiguë au fluor*

Dans des cellules HK-2 exposées durant 24 heures à 0.5, 1, 1.5 et 2 mM de NaF, on constate une induction de l'activité apoptotique de respectivement 14.5, 16.6, 42.6 et 54.8 % en comparaison avec le groupe contrôle (**figure 48**). Bien que nous n'ayons pas pu reproduire ce test avant l'arrêt des expérimentations *in vitro*, ces résultats semblent indiquer que le fluor serait capable d'induire l'apoptose de manière dose-dépendante dans des cellules rénales humaines.



---

**DISCUSSION**

---



L'uranium et le fluor sont des substances d'origine naturelle et anthropogénique auxquelles l'Homme peut être exposé à faible dose. Elles s'accumulent de manière préférentielle dans le rein, du fait de ses fonctions de filtration, de transport et de réabsorption, et plus particulièrement dans la zone tubulaire proximale (Manocha et al. 1975; Paquet et al. 2006; Poisson et al. 2014; Usuda et al. 1998). Ces substances sont néphrotoxiques lors d'une exposition aiguë, cependant des études précédentes ont montré l'absence d'effets délétères dans le rein après une exposition chronique à l'uranium (Dublineau et al. 2014; Gueguen et al. 2014; Poisson et al. 2014) ou au fluor (Cardenas-Gonzalez et al. 2016; Chattopadhyay et al. 2011), laissant supposer l'existence d'une réponse adaptative à faible dose.

Cette thèse a permis de mettre en évidence une réponse adaptative rénale et d'en identifier certains mécanismes moléculaires, grâce à l'utilisation d'un protocole spécifique d'exposition prime à de faibles doses d'uranium ou de fluor suivie d'un traitement challenge néphrotoxique. Au cours de cette dernière partie nous comparerons plus largement l'uranium et le fluor, en discutant notamment des effets phénotypiques rénaux induits lors d'une exposition aiguë ou chronique, des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués ou potentiellement impliqués dans la réponse adaptative, ainsi que des voies de signalisation. Cette discussion permet également d'aborder de nouvelles perspectives qui permettraient de répondre aux interrogations soulevées à la suite des résultats obtenus.

L'uranium est une substance néphrotoxique connue lors d'une exposition aiguë chez l'Homme et chez l'animal (Kathren and Burklin 2008; Vicente-Vicente et al. 2010). Dans les gammes de doses (1 à 5 mg/kg) utilisées lors de notre étude dose-réponse aiguë, l'uranium induit une nécrose tubulaire, et des modifications biochimiques urinaires révélant des altérations rénales anatomiques et fonctionnelles (Gueguen and Rouas 2012; Sangeetha Vijayan et al. 2016; Zimmerman et al. 2007). Ainsi, après traitement aigu nous avons effectivement observé une induction significative de la glycosurie et de la nécrose cellulaire dans la zone tubulaire rénale, à partir de 4 et 5 mg/kg d'uranium, respectivement (Bontemps et al. 2019). Bien que la littérature sur les effets aigus du fluor soit plus limitée, il est également décrit une induction des lésions rénales chez le rat après injections intraveineuses de fluor (3 à 9 mg/kg de fluor), caractérisée par un dysfonctionnement tubulaire (diurèse, réabsorption protéique et excrétion de calcium et phosphate augmentées) (Dote et al. 2000a; Santoyo-Sanchez et al. 2013). Conformément à ces résultats, nous avons observé une diurèse dose-dépendante chez la souris à partir de 5 mg/kg de fluor (Bontemps et al. 2019). À plus forte dose de fluor (10 mg/kg), une nécrose et une régénération tubulaire sont induites dans notre modèle rongeur, tout comme chez le lapin exposé durant 15 semaines à des doses comprises entre 5 et 50 mg/kg/jour de NaF (Shashi et al. 2002).

Les marqueurs précoces de néphrotoxicité, OPN, CLU et KIM-1 sont induits dans le rein après des traitements aigus à l'uranium et au fluor, à partir des doses respectives de 2 et 7.5 mg/kg. De plus, dans nos conditions les traitements au fluor induisent l'excrétion urinaire des 2 marqueurs étudiés (KIM-1 et CLU), tandis que seule CLU est détectée dans les urines des souris traitées à l'uranium. L'expression *in situ* (immunohistochimie) de ces biomarqueurs a également été observée chez le rat suite à un traitement aigu de 5 mg/kg d'uranium (Fujigaki et al. 2003) ou un traitement chronique de



40 jours à la concentration de 50 mg/L de fluor (Cardenas-Gonzalez et al. 2013). Par contre, nos travaux sont à notre connaissance les premiers à démontrer l'induction *in situ* de KIM-1 dans le rein après une exposition au fluor. La protéine KIM-1 est également induite dans les reins des souris traitées à l'uranium, dès la dose de 2 mg/kg, confirmant ainsi les résultats d'Iwakura *et al.* obtenus chez des rats, 48 heures après un traitement de 4 mg/kg d'uranium (Iwakura et al. 2016).

De nombreuses études ont démontré qu'il existait une bonne corrélation entre les expressions géniques rénales de KIM-1 ou CLU et leur sécrétion urinaire (Aulitzky et al. 1992; Correa-Rotter et al. 1998; Rouas et al. 2011). Dans notre étude, les cinétiques d'expression tissulaire et d'excrétion urinaire de ces biomarqueurs diffèrent selon que les souris soient exposées à l'uranium ou au fluor. Ainsi, la protéine KIM-1 est détectée uniquement *in situ* (protéine et gène), 72 heures après injection IP d'uranium, et pas au niveau urinaire, 24 heures après le traitement à l'uranium. Alors que le traitement au fluor induit son expression *in situ* et son excrétion urinaire à ces 2 temps. Les différences observées entre l'uranium et le fluor peuvent s'expliquer par les délais existants entre le traitement par injection et les analyses effectuées dans les urines récupérées 24 heures après, ou dans les reins récupérés 72 heures après traitement. Cela laisse supposer une cinétique de toxicité différente entre l'uranium et le fluor : un mécanisme d'action plus lent aurait lieu dans le cas de l'uranium, difficilement décelable 24 heures après traitement, alors qu'un mécanisme de néphrotoxicité plus rapide aurait lieu dans le cas du fluor, détectable dès les premières 24 heures.

**L'étude dose-réponse aiguë à l'uranium et au fluor a permis de mettre en évidence l'induction de biomarqueurs tels que KIM-1, CLU et OPN, avec une néphrotoxicité modérée aux doses respectives de 5 et 7.5 mg/kg d'uranium et de fluor.**

**Les cinétiques de néphrotoxicité aiguë de l'uranium et du fluor sont différentes, avec un mécanisme plus rapide dans le cas du fluor, décelable dès 24 heures après traitement.**

Durant notre second protocole d'exposition chez l'animal, des souris sont pré-exposées aux concentrations prime puis injectées avec le traitement challenge. Aucun effet diurétique du fluor n'est observé chez les animaux recevant l'injection IP de 7.5 mg/kg de fluor seulement. De plus, les résultats obtenus lors de l'analyse histopathologique montrent une augmentation du score d'atteinte global après les traitements challenge à l'uranium et au fluor, mais sans que celle-ci ne soit statistiquement significative. Cette néphrotoxicité moindre en comparaison au groupe contrôle pourrait s'expliquer par l'âge des souris au moment des euthanasies, puisque les animaux témoins de cette étude chronique présentent plus de lésions basales que ceux de l'étude d'exposition aiguë.

Suite aux nombreux questionnements sur l'existence ou non d'une réponse néphrotoxique suite à une exposition chronique à l'uranium ou au fluor, la mise en place de notre protocole d'exposition prime suivie d'un traitement challenge a permis d'identifier la mise en place d'une réponse adaptative. Elle est observée pour les doses respectives de 20 et 50 mg/L d'uranium et de fluor, grâce à l'analyse des biomarqueurs de néphrotoxicité précoce KIM-1 et CLU. Lors d'une exposition chronique de 9 mois, aucun effet néphrotoxique n'a été détecté chez le rat à cette concentration





d'uranium (Dublineau et al. 2014; Poisson et al. 2014). Une contamination chronique au fluor à la concentration de 50 mg/L induit des marqueurs de néphrotoxicité tels que KIM-1, CLU, OPN et les protéines urinaires chez le rat, laissant supposer qu'une telle concentration pourrait être néphrotoxique chez le rongeur (Cardenas-Gonzalez et al. 2013). Dans nos conditions, les traitements challenge seuls induisent également les biomarqueurs KIM-1 et CLU, mais une pré-exposition de 6 mois à 20 mg/L d'uranium ou à 50 mg/L de fluor annule cette induction, pour revenir à une expression basale de ces gènes, similaire aux groupe témoin non-exposés. Dans le cas du fluor, cette réponse adaptative est confirmée par la sécrétion urinaire moindre de KIM-1 et de CLU en comparaison au contrôle positif recevant la dose challenge seule. Dans le cas de l'uranium, on constate également une excrétion moindre de la CLU dans les urines du groupe 20 mg/L en comparaison avec le groupe recevant la dose challenge seule.

La protéine KIM-1 est connue pour jouer un rôle cytoprotecteur dans les cellules rénales puisque cette dernière est impliquée dans la phagocytose des débris cellulaire issus de l'apoptose des cellules des TCP (Brooks et al. 2015; Ichimura et al. 2008). Or, nous avons démontré que la néphrotoxicité aiguë de l'uranium passait par une activité apoptotique des cellules rénales (Bontemps et al. 2019). Nous pouvons ainsi supposer que la protéine KIM-1, exprimée *in situ* dans les TCP du groupe pré-exposé à 20 mg/L d'uranium, joue un rôle cytoprotecteur face à l'apoptose induite par la dose challenge d'uranium, expliquant ainsi en partie la réponse adaptative observée à cette concentration.

**Une réponse adaptative à l'uranium et au fluor est observée chez les souris exposées chroniquement aux doses respectives de 20 et 50 mg/L, avec un retour au niveau basal des expressions géniques et/ou des sécrétions urinaires de KIM-1 et CLU.**

**La surexpression *in situ* de la protéine KIM-1 dans les cellules rénales pourrait jouer un rôle cytoprotecteur et être potentiellement impliquée dans la réponse adaptative à l'uranium.**

Les études épidémiologiques et expérimentales portant sur la néphrotoxicité de l'uranium et du fluor après une exposition à faible dose ne permettent pas de conclure quant au risque sanitaire de telles expositions. Les populations buvant des eaux plus fortement concentrées en uranium (jusqu'à 781 µg/L) que les recommandations OMS (30 µg/L) présentent une glycosurie, ainsi qu'une sécrétion urinaire élevée de calcium et de phosphate sans indication d'atteinte glomérulaire (Kurttio et al. 2002; Zamora et al. 1998), mais avec une induction de PAL et de la protéine B2MG, pouvant indiquer une atteinte tubulaire (Zamora et al. 1998). Certaines études réalisées sur le fluor montrent qu'une exposition chronique peut engendrer des effets néphrotoxiques, notamment chez l'Homme (Liu et al. 2005), caractérisés par des concentrations urinaires élevées des biomarqueurs d'altération tubulaire cys-C, KIM-1, CLU, NAG et γGT, un déséquilibre de la balance électrolytique et une altération de la fonction rénale (Jimenez-Cordova et al. 2018; Michael et al. 1996; Schiffli 2008; Xiong et al. 2007). L'altération de la fonction tubulaire a été associée à une exposition environnementale au fluor (Khandare et al. 2017), avec notamment des dommages de l'épithélium tubulaire, une lyse et vacuolisation cellulaire, ainsi que de la nécrose et de l'apoptose dans les biopsies rénales de



patients ayant eu des syndromes néphrotiques durant l'enfance et possédant un taux élevé de fluor dans les urines (Quadri et al. 2018b).

Cependant, il existe une controverse sur les effets délétères de l'uranium et du fluor chez l'Homme. Bien qu'une tendance ait été observée dans l'induction de B2MG dans une cohorte suédoise exposée à l'uranium, aucune néphrotoxicité n'a pu être mise en évidence, et ce malgré une concentration en uranium urinaire plus de 8 fois supérieure à la normale (Selden et al. 2009). De plus, les études épidémiologiques n'ont pas démontré d'augmentation de la mortalité par maladies urogénitales ou rénales chez des cohortes professionnellement exposées à l'uranium (Checkoway et al. 1988; Dupree et al. 1987; Lundin 1969; Polednak and Frome 1981). Quelques études très récentes ont montré qu'un excès de décès par cancer du rein est observé chez les travailleurs du nucléaire (Golden et al. 2019; Yiin et al. 2018), mais l'association entre exposition à l'uranium et cancer du rein reste controversée dans les études épidémiologiques (Rage et al. 2015; Tirmarche 2018). La majorité des études de suivis à long terme n'ont pas pu démontrer d'induction de dommages rénaux après exposition chronique à l'uranium (ATSDR 2013; Eisenbud and Quigley 1956; Luessenhop et al. 1958). De la même manière, des études épidémiologiques menées sur des cohortes exposées au fluor n'ont pas pu démontrer que ce xénobiotique seul induisait une augmentation du risque d'apparition d'IRC (ATSDR. 2003; Wasana et al. 2016).

Les résultats expérimentaux d'exposition chronique à l'uranium et au fluor sont également controversés. Une étude précédente visant à déterminer une NOAEL chez des rats exposés chroniquement à l'uranium (0.96 à 600 mg/L soit 0,02 à 40 mg/kg) *via* l'eau de boisson (Gilman et al. 1998) a rapporté l'apparition de lésions tubulaires et glomérulaires dès la plus faible concentration, mais sans aggravation en fonction de la dose. L'induction de lésions histologiques rénales est par ailleurs démontrée pour des concentrations plus élevées d'uranium, entre 16 et 200 mg/kg (Ortega et al. 1989; Zhu et al. 2009). Des effets néphrotoxiques ont été observés lors d'une exposition chronique au fluor chez des souris traitées de 15 à 150 mg/L durant 30 à 90 jours qui présentent une sévère altération structurelle du rein (Chattopadhyay et al. 2011). De plus, plusieurs études ont démontré que le fluor induisait un stress oxydatif rénal après une exposition chronique de 25 à 200 mg/L (Ranjan et al. 2009; Shanthakumari et al. 2004), pouvant ainsi mener à l'apoptose cellulaire, et à une altération de la fonction rénale (Barbier et al. 2010; Xu et al. 2006). Cependant, les résultats obtenus lors de certaines études d'exposition chronique à l'uranium et au fluor ont soulevé des questionnements sur leurs effets néphrotoxiques à faibles doses. La plupart des études réalisées depuis celle de Gilman et al. en 1998 ont montré que l'uranium, lorsqu'il est délivré de manière chronique dans l'organisme, n'induit pas de néphrotoxicité avérée à des doses allant de 1 à 600 mg/L (Dublineau et al. 2014; Grison et al. 2016; Gueguen et al. 2014; Poisson et al. 2014; Rouas et al. 2011). En effet, après 9 mois de contamination à 40 mg/L d'uranium chez le rat, aucune lésion histologique rénale n'a été observée, ni aucune induction de biomarqueurs de néphrotoxicité, avec un DFG normal et également une induction de facteurs cytoprotecteurs tel que le glutathion (Poisson et al. 2014). L'hypothèse d'une réponse adaptative a donc été émise, notamment du fait de l'induction d'enzymes (CYP) du métabolisme des xénobiotiques (Gueguen et al. 2014). Chez des rats s'étant rétablis d'une première exposition à l'uranium (0.2 ou 1 mg/kg en injection intraveineuse), on constate une résistance à un second traitement à l'uranium plus fortement concentré (4 mg/kg) délivré 14 jours plus tard. Une activation de la prolifération cellulaire et une diminution de l'activité



apoptotique sont notamment observées, traduisant l'induction de mécanismes rénoprotecteurs à des doses sub-toxiques d'uranium (Iwakura et al. 2016; Sun et al. 2010). Les hypothèses émises dans les conclusions de l'ensemble de ces études récentes sont les suivantes : l'uranium n'induirait pas d'effets délétères lors d'une exposition chronique à de faibles doses, et une pré-exposition chronique pourrait permettre la mise en place d'une réponse adaptative, en fonction de la dose et du temps d'exposition. Les résultats obtenus durant cette thèse tendent à confirmer cette dernière hypothèse

Expérimentalement, une exposition chronique de 40 jours à de faibles doses de fluor, comprises entre 15 et 50 mg/L, diminue la néphrotoxicité induite par un second traitement à la gentamicine chez le rat (Cardenas-Gonzalez et al. 2016). Cette pré-exposition au fluor rétablit un DFG plus proche de la normale, et réduit l'expression des biomarqueurs KIM-1, CLU, OPN, B2MG et cys-C induite par la gentamicine. Après 60 jours d'exposition à cette dose de fluor, les animaux ne présentent pas d'altération histologique (Kobayashi et al. 2009) bien que le fluor induise des marqueurs de néphrotoxicité tels que KIM-1, CLU, OPN et les protéines urinaires chez le rat (Cardenas-Gonzalez et al. 2013). Dans le cadre de notre étude nous avons observé une réponse adaptative lors d'une exposition à 50 mg/L durant 6 mois chez la souris. Ces différences pourraient s'expliquer par les durées et les doses d'exposition. En effet les mécanismes adaptatifs ne sont pas toujours activés de manière continue et il se peut qu'une cinétique différente soit responsable d'effets biologiques adaptatifs, tel que montré dans des modèles expérimentaux exposés à divers stressseurs (Feinendegen et al. 2011; Gueguen et al. 2019; Lagarde et al. 2015; Le Gallic et al. 2015; Matsumoto et al. 2007). Cardenas *et al.* soupçonnaient que la réponse adaptative observée dans leur étude soit due au fait que le fluor pourrait réduire l'internalisation de la gentamicine dans les TCP, réduisant ainsi son accumulation, et par conséquent sa toxicité rénale (Cardenas-Gonzalez et al. 2016). Grâce à notre étude, nous démontrons qu'une pré-exposition au fluor engendre également une réponse adaptative par le biais d'autres mécanismes biologiques, décrits par la suite.

**Nos résultats confirment la complexité liée aux effets rénaux de l'uranium et du fluor lors d'une exposition chronique, avec l'existence d'une réponse adaptative dans des gammes de doses et de temps bien spécifiques.**

Pour nous permettre de qualifier un mécanisme cellulaire de mécanisme adaptatif, il nous faut observer une induction de ce mécanisme aux concentrations auxquelles nous avons observé une réponse adaptative (20 mg/L d'uranium et 50 mg/L de fluor), sans que celui-ci ne soit induit chez les animaux ne recevant que la dose challenge. Lors de ces travaux, nous avons étudié les voies cellulaires et moléculaires susceptibles d'être induites lors d'une réponse adaptative à faible dose : la régulation de l'apoptose et de l'inflammation, l'autophagie, ou encore la réponse UPR (Gueguen et al. 2019; Kroemer et al. 2010; Schroder 2006; Szumiel 2012).

L'uranium est capable d'induire l'apoptose dans le rein lors d'un traitement aigu. Son induction est observée *in vitro* dans des cellules de TCP de rats (Thiebault et al. 2007) ou *in vivo*, avec notamment



l'induction de l'expression de gènes impliqués dans l'apoptose dans les reins de souris injectées avec une unique dose de 5 mg/kg d'uranium (Taulan et al. 2006). Soixante-douze heures après un traitement aigu à l'uranium, nous avons mis en évidence une induction de l'activité apoptotique (caspases effectrices 3 et 7) dans le rein chez la souris (Bontemps et al. 2019), conformément aux résultats obtenus par Sangeetha Vijayan *et al.* (2019) qui démontrent que des injections IP de 2 et 4 mg/kg d'uranium induisent l'apoptose à partir de 72 heures et jusqu'à 14 jours après traitement. L'activation de ces caspases effectrices dans le rein à partir de la dose de 2 mg/kg d'uranium confirme les résultats précédemment obtenus chez le rat (Hao et al. 2015). En revanche, un traitement aigu au fluor n'induit pas d'apoptose dans nos conditions.

Lors de notre protocole spécifique d'étude de la réponse adaptative, l'activité des caspases 3/7 pour les groupes pré-exposés à 20 et 40 mg/L d'uranium retourne à un niveau basal, nous permettant ainsi de conclure sur l'implication d'un système de régulation de l'activité apoptotique caspase dépendante dans la réponse adaptative à l'uranium. Cette réduction de l'apoptose a notamment été observée lors de l'exposition d'embryons de poissons zèbres à de faibles concentrations d'UA (10 µg/L), tandis qu'une exposition à une plus forte concentration (100 µg/L) induit l'apoptose dans le même modèle, témoignant ainsi d'un effet adaptatif (Ng et al. 2016). Dans le cas d'une exposition chronique à d'autres métaux, tels que le cadmium, il a également été constaté une diminution du stress oxydatif et de l'apoptose lors d'une exposition chronique en comparaison à une exposition aiguë seule (Liu et al. 2009; Nair et al. 2015). *A contrario*, aucune induction des activités des caspases effectrices 3 et 7 n'est observée après une exposition chronique et/ou aiguë au fluor *in vivo*. Cependant, nos résultats obtenus *in vitro*, bien que non reproduits, montrent qu'une exposition aiguë de 24 heures à des concentrations allant de 0.5 à 2 mM induit l'apoptose des cellules rénales humaines HK-2. *In vivo*, des études ont démontré qu'une exposition chronique à la concentration de 50 mg/L de fluor durant 150 jours induisait l'apoptose dans le foie de souris (Zhao et al. 2018). Wei *et al.* ont également montré une activation des caspases 9 et 3 ainsi qu'une augmentation de l'expression du facteur inducteur de l'apoptose AIF et une diminution de l'expression du facteur anti-apoptotique XIAP dans les reins de souris traitées au NaF (12, 24 et 48 mg/kg) pendant 42 jours (Wei et al. 2018). Ces différences avec nos résultats pourraient s'expliquer par une réponse tissu et temps dépendante. Bien que dans nos conditions la voie apoptotique menant à l'activation des caspases 3/7 ne soit pas induite par le fluor, l'apoptose pourrait tout de même faire partie des mécanismes induits. En effet, il serait intéressant d'étudier *in vivo* la voie apoptotique caspase indépendante pouvant être déclenchée par une activation prolongée de la réponse UPR et de la protéine CHOP, tel que démontré précédemment dans d'autres modèles *in vivo* et *in vitro* exposés au fluor (Deng et al. 2016; Liu et al. 2015).

**L'apoptose est un mécanisme impliqué dans la néphrotoxicité aiguë induite par l'uranium et dont l'inhibition est observée lors d'une pré-exposition à 20 mg/L d'uranium. Nous pouvons alors affirmer que la régulation de l'apoptose fait partie des mécanismes adaptatifs induits en réponse à une contamination chronique à l'uranium.**

**En revanche, l'apoptose n'est pas induite par un traitement aigu au fluor dans nos conditions, et ne fait donc pas partie des mécanismes responsables de la réponse adaptative observée à 50 mg/L.**





Dans le cas de l'uranium, la régulation négative des caspases observée chez les animaux pré-exposés à 20 mg/L n'est pas corrélée à l'expression du taux d'ARNm de Bax ou de Bcl-2. En effet, l'expression génique de Bcl-2 est induite chez toutes les souris traitées à l'uranium, sans différence significative intergroupe. Ces facteurs sont pourtant connus pour être impliqués dans l'apoptose induite par un traitement aigu à l'uranium dans les cellules rénales humaines HK-2 (Hao et al. 2014), ainsi que chez des souris traitées par injection IP avec 10 mg/kg (Hao et al. 2015). Il se pourrait alors qu'une modulation de leurs expressions soit bien responsable de la régulation apoptotique observable dans nos conditions, mais que celle-ci intervienne en amont et ne soit pas décelable 72 heures après traitement. Afin d'explorer les différentes voies pouvant mener à la modulation de l'activation des caspases effectrices, il aurait été intéressant d'étudier également la voie des récepteurs de mort FasR. Une surexpression des ligands solubles FasL ainsi que des récepteurs FasR est induite dans la lignée cellulaire HK-2 après un traitement de 500  $\mu$ M, menant ainsi à l'activation de la caspase 8 et à l'apoptose cellulaire (Hao et al. 2014). Cette voie est donc potentiellement impliquée dans la régulation de l'apoptose observée lors de notre protocole d'étude de la réponse adaptative à l'uranium. En comparaison, il est intéressant de noter que dans le cas du fluor, seules les souris pré-exposées à de faibles doses prime présentent une augmentation de l'expression génique de Bcl-2. De plus, les taux d'ARNm de Bax et de la caspase 3 sont significativement réduits en comparaison avec le groupe contrôle et avec les groupes recevant la dose challenge seule chez les animaux pré-exposés à 30 mg/L de fluor. Ces résultats ne sont pas confirmés par les dosages de l'activité enzymatique des caspases effectrices 3 et 7, qui sont en aval de la cascade apoptotique induite par la régulation de Bax et de Bcl-2. On pourrait supposer qu'à un temps d'analyse plus tardif ces modulations géniques pourraient mener à l'activation des caspases effectrices 3 et 7, non observable 72 heures après traitement. Il serait également intéressant de compléter ces résultats avec une autre méthode de détection de l'apoptose, telle que la méthode TUNNEL par exemple.

La protéine p53 est connue pour réguler les concentrations protéiques de Bax et de Bcl-2 dans la cellule, induisant ainsi l'apoptose mitochondriale. Chez des souris exposées à de fortes concentrations de fluor (24 et 48 mg/kg/j pendant 21 et 42 jours) on observe une induction de l'expression génique d'ATM et de p53, ainsi que de leur expression protéique sous forme phosphorylée, donc active (Luo et al. 2018; Wei et al. 2018). L'implication de p53 dans la toxicité aiguë du fluor laisse à penser que cette voie moléculaire pourrait également intervenir dans la régulation de l'apoptose après une exposition chronique. Notamment, une inhibition de la protéine p53 pourrait expliquer l'induction génique de Bcl-2 observée chez les souris pré-exposées au fluor. L'activation de p53 est également un événement essentiel des mécanismes de réparation des dommages à l'ADN *in vitro* (Sasaki et al. 2002) et *in vivo* (Mitchel 2015). Or, il est largement établi que des dommages à l'ADN sont induits à la suite d'une exposition à l'uranium (Asic et al. 2017; Jin et al. 2017; Miller 2007; Miller et al. 2002b; Monleau et al. 2006a; Monleau et al. 2006b; Thiebault et al. 2007; Yazzie et al. 2003; Yellowhair et al. 2018) ou au fluor (Bhowmik and Chattopadhyay 2019; Manivannan et al. 2013; Podder et al. 2008; Podder et al. 2011a; Podder et al. 2011b; Tripathi et al. 2009). À défaut d'avoir pu étudier les réparations des CDB avec l'immunomarquage de  $\gamma$ -H2AX, il serait donc intéressant d'étudier l'activation de p53 ainsi que les différents mécanismes adaptatifs de réparation à l'ADN (système NHEJ, BER et NER).



**Il serait intéressant d'identifier les différentes voies par lesquelles l'apoptose est induite lors d'un traitement à l'uranium : p53, puis la caspase 9 dans le cas d'une apoptose mitochondriale, ainsi que FasR et la caspase 8, dans le cas d'une apoptose médiée par les récepteurs de mort.**

L'inflammation tissulaire rénale serait en partie responsable de l'atteinte rénale induite lors d'une exposition à l'uranium ou au fluor. Durant nos travaux, l'inflammation est étudiée à travers l'expression des molécules d'adhésion ICAM et VCAM qui sont impliquées dans le recrutement de cellules inflammatoires et dont la surexpression dans le rein traduit une inflammation (Akçay et al. 2009) et une altération rénale (Gilbert et al. 1979; Guerrero-Beltran et al. 2012; Li et al. 2009). Les résultats obtenus lors de notre étude dose-réponse aiguë ont montré l'induction génique des CAMs après traitement au fluor, et une légère induction de l'expression protéique *in situ* d'ICAM après un traitement à la dose spécifique de 10 mg/kg. Dans le cas d'un traitement aigu à l'uranium, seul l'expression génique et protéique de VCAM est induite à partir de 4 mg/kg. L'uranium comme le fluor sont donc capables d'induire une inflammation rénale après un traitement aigu chez la souris, confirmant des études précédentes qui ont montré l'induction de l'expression de gènes impliqués dans l'inflammation, 48 heures après des injections de 5 mg/kg d'uranium chez la souris (Taulan et al. 2006).

Lors du protocole d'étude de la réponse adaptative, les animaux exposés à l'uranium présentaient un taux de mRNA d'ICAM et VCAM supérieur au contrôle après un traitement aigu de 5 mg/kg. De plus, nous observons une induction de l'expression des gènes ICAM (10 et 40 mg/L) et VCAM (10 mg/L) sous certaines conditions alors qu'elles ne sont pas visibles chez le groupe pré-exposé à 20 mg/L d'uranium, concentration à laquelle apparaît notre réponse adaptative. Cependant, ces résultats n'ont pas été confirmés par l'expression *in situ* de VCAM, ne nous permettant pas de conclure sur la régulation du recrutement de cellules inflammatoires dans la réponse adaptative à l'uranium. Dans le cas du fluor, l'expression *in situ* de VCAM indique une réponse de type adaptatif aux doses de 30 et 50 mg/L de fluor, avec un retour à un taux d'expression basal, significativement réduit en comparaison au groupe traité uniquement avec la dose challenge. Cette diminution de l'expression de VCAM peut mener à une réduction de l'inflammation rénale observée après le traitement challenge seul, et expliquer ainsi en partie la réponse adaptative visible après une pré-exposition à 50 mg/L de fluor. Étant donné que la molécule ICAM est surexprimée dans les reins de souris pré-exposées à 30 mg/L de fluor, aucune conclusion ne peut être tirée quant à la modulation du recrutement des cellules inflammatoires à cette concentration.

**Le recrutement de cellules inflammatoires serait un mécanisme induit lors d'un traitement aigu à l'uranium ou au fluor.**

**Les études moléculaires semblent montrer l'implication des molécules CAM dans la réponse adaptative à 20 mg/L d'uranium, mais ces résultats ne sont pas confirmés *in situ*.**

**La régulation du recrutement des cellules inflammatoires a été identifiée comme un mécanisme adaptatif induit en réponse à une contamination chronique au fluor, avec une diminution de l'expression de VCAM pouvant mener à une réduction de l'inflammation chez les animaux pré-exposés à 50 mg/L.**



Des études précédentes ont démontré que des métaux capables d'interférer avec le calcium pouvaient moduler l'inflammation. Les ions  $Pb^{2+}$  peuvent se substituer au calcium dans l'activation de la calmoduline, menant ainsi à une régulation négative de l'activité iNOS (Gribovskaia et al. 2005; Simons 1993). De plus, l'uranium est connu pour perturber la signalisation calcique, notamment par des échanges des ions uranyles avec le calcium à la surface des os, et par l'inhibition des transporteurs du calcium (Desmedt et al. 1993; Thompson and Nechay 1981). On peut donc supposer que l'uranium serait également capable d'inhiber la production de NO *via* une interaction avec la calmoduline. Zheng *et al.* (2015) ont ainsi montré qu'une exposition aiguë à l'uranium induisait une inflammation rénale avec une augmentation du facteur iNOS (Zheng et al. 2015). Il serait donc intéressant d'étudier cette voie dans le cas d'une pré-exposition chronique visant à étudier la réponse adaptative.

Des études cinétiques (3, 6 et 9 mois) de contamination chronique à l'uranium ou à de faibles doses de césium 137 ont mis en évidence l'importance du choix du end-point auquel est analysé le profil inflammatoire chez le rongeur (Dublineau et al. 2007; Le Gallic et al. 2015). Dans ces études, les auteurs ont constaté une modification du profil inflammatoire en faveur d'une réponse bénéfique pour l'organisme à partir de 6 mois d'exposition, mais pas à 3 mois. Cela souligne l'activation transitoire des facteurs pro-/anti-inflammatoires lors d'une contamination chronique et l'intérêt de reproduire une étude cinétique des mécanismes d'adaptation mis en place lors d'une contamination chronique à l'uranium ou au fluor.

La voie NFκB représente une des voies majeures de l'inflammation et est impliquée dans la réponse anti-inflammatoire adaptative aux faibles doses de radiation (Prasad et al. 1994; Rodel et al. 2004), probablement à travers une interaction entre NFκB et TGF-β1. La voie NFκB peut notamment intervenir dans la diminution de IL-1β, p38-MAPK et Akt, tel que démontré dans la réponse adaptative aux faibles doses de rayonnements (Gueguen et al. 2019; Lodermann et al. 2012). L'activation de cette voie a été mise en évidence dans des modèles exposés à l'uranium ou au fluor. Zheng *et al.* (2015) ont notamment montré qu'une injection IP de 5 mg/kg d'uranium induisait une inflammation rénale médiée par la voie NFκB, associée à une augmentation des facteurs TNF-α, iNOS et COX-2 (Zheng et al. 2015). *In vitro*, une exposition au fluor de cellules de la microglie BV2 induit la translocation au noyau de NFκB, dès la concentration de 250 μM, traduisant son activation en tant que facteur de transcription (Chen et al. 2017). L'activation de NFκB est également observable *in vivo* chez la souris, dès la concentration de 12 mg/kg, avec une réduction de l'expression de cytokines anti-inflammatoires, menant à une inflammation rénales (Luo et al. 2017). Il serait alors intéressant d'explorer le rôle de cette voie dans la régulation de l'inflammation en réponse au fluor.

Étant donné que l'apoptose est régulée dans la réponse adaptative à l'uranium, et qu'une modulation des taux de mRNA des molécules pro-inflammatoires CAMs est induite, il est probable que NFκB joue un rôle, du moins partiel, dans cette réponse à l'uranium. De plus, la voie NFκB peut être induite en amont d'une réponse antioxydante, notamment par l'induction des enzymes SOD après un traitement au thiol ou après l'activation d'Akt (Murley et al. 2006; Park et al. 2013). La stimulation des enzymes antioxydantes est un mécanisme précédemment identifié chez le rongeur exposé en chronique à l'uranium ou au fluor. Notamment, une augmentation du taux de glutathion après 9 mois de contamination à l'uranium (Poisson et al. 2014) et une augmentation de l'activité de



la GST après une exposition de 30 jours à 15 mg/L de fluor (Chattopadhyay et al. 2011) ont été observées. Il serait donc d'autant plus intéressant d'étudier la voie NFκB ainsi que ces effets potentiels sur le stress oxydatif dans notre protocole.

**Du fait de son rôle dans l'inflammation, l'apoptose et le stress oxydatif, la voie NFκB représente une piste intéressante à étudier.**

**Des analyses supplémentaires aux nôtres seraient nécessaires afin de confirmer nos résultats obtenus avec ICAM et VCAM, notamment par la mesure de cytokines pro- et anti-inflammatoires, ainsi que d'INOS et de COX-2.**

**L'activation transitoire des facteurs pro-/anti-inflammatoires lors d'une contamination chronique souligne l'importance d'une étude cinétique comprenant plusieurs temps d'étude afin de bien identifier la modulation de l'inflammation dans la réponse adaptative.**

Tout comme le rein, l'os est un organe dans lequel s'accumule l'uranium, faisant ainsi partie des cibles de ses effets toxiques. Des études récentes ont montré que l'autophagie est induite *in vitro* par l'uranium dans les cellules osseuses. (Hurault et al. 2019; Pierrefite-Carle et al. 2016). L'autophagie est un mécanisme de survie qui joue un rôle clé dans la réponse adaptative face à des conditions de stress. Il peut également être induit dans le rein par divers stressseurs (Liu et al. 2014), mais à notre connaissance cette étude est la première à avoir mis en évidence l'activation de l'autophagie après une exposition à l'uranium dans le rein. L'expression *in situ* de la protéine LC3B, recrutée lors de la formation des autophagosomes dans le processus autophagique, est induite indifféremment dans tous les groupes traités à l'uranium, ne confirmant pas l'induction génique observée seulement lors d'une pré-exposition à 10 mg/L. L'implication de l'autophagie dans la réponse adaptative à l'uranium n'est donc pas démontrée dans cette étude car ce mécanisme est induit après le traitement challenge, que les animaux soient pré-exposés ou non. En comparaison, le fluor n'induit pas de marqueurs de l'autophagie dans notre étude, ni en traitement aigu seul, ni après une pré-exposition chronique à de faibles doses. L'induction de l'autophagie par le fluor est cependant observée *in vitro* dans des neuroblaste SH-SY5Y, avec notamment une diminution d'expression d'Atg5 et de LC3B et une induction de p62 (Tang et al. 2017), tandis que d'autres études ont démontré son induction dans le foie de souris exposées à 50 et 100 mg/L de fluor (Suzuki and Bartlett 2014; Zhao et al. 2018). Bien que ces derniers résultats aient été obtenus dans un autre organe, l'induction de l'autophagie chez la souris reste une piste intéressante à investiguer.

À notre connaissance, les résultats de notre étude sont les premiers à démontrer l'induction de la réponse UPR dans le rein par l'uranium et le fluor après traitement aigu, précédé ou non d'une exposition chronique. D'autres métaux, tels que le plomb ou le cadmium, sont capables d'induire un stress du RE dans le rein ainsi qu'une induction des protéines chaperonnes GRP78 et GRP94 (Cybulsky 2017; Kitamura 2008). Cependant, les expressions géniques de ces protéines ne sont pas induites par l'uranium dans nos conditions. En revanche, l'expression génique d'IRE1-α augmente dans les groupes pré-exposés à 10 et 20 mg/L d'uranium, alors qu'aucune induction n'est constatée lors d'un traitement challenge seul. Cette induction visible uniquement chez les animaux pré-exposés à 10 ou 20 mg/L d'uranium n'a pas été confirmée *in situ* puisque la protéine IRE1-α est





induite dans tous les groupes, pré-exposés ou non. Nous ne pouvons donc pas conclure quant à l'implication de l'activation de la réponse UPR par la voie IRE1- $\alpha$  dans la réponse adaptative rénale mise en place après une exposition chronique à l'uranium. De la même manière, la réponse UPR est induite *in situ* chez toutes les souris traitées au fluor, qu'elles aient été pré-exposées chroniquement à de faibles doses ou non. Une étude de la littérature menée sur des ostéoblastes de rats exposés au fluor *via* l'eau de boisson a démontré que le stress du RE pouvait être induit après une exposition chronique seule (sans traitement challenge), mais à des concentrations supérieures à celles que nous avons étudiées (100 et 150 mg/L), alors qu'à 50 mg/L l'activation de la réponse UPR n'était pas détectée (Liu et al. 2015). Une exposition chronique au fluor induit la réponse UPR, après une dose de 12 mg/kg durant 21 ou 42 jours, ou dès 10 mg/kg/jour durant 1 à 3 mois chez le rat (Deng et al. 2016; Sun et al. 2014). Les HSP sont des protéines chaperonnes impliquées dans la réponse UPR, et induites en cas de stress cellulaire afin de garantir la bonne conformation des protéines dans la cellule (Chakrabarti et al. 2011). Une induction de la protéine Hsp70 a été observée dans des reins de souris exposées à 15 mg/L de fluor durant 30 jours (Chattopadhyay et al. 2011), indiquant la potentielle activation de la réponse UPR lors d'un traitement chronique au fluor (Radons 2016). Ces résultats ont été confirmés avec l'induction de la protéine cytoprotectrice Hsp72, connue pour pouvoir activer la réponse UPR notamment *via* la phosphorylation d'IRE1- $\alpha$  (Gupta et al. 2010), après une préexposition de 40 jours au fluor (15 et 50 mg/L) chez la souris (Cardenas-Gonzalez et al. 2016). L'ensemble de ces résultats tend à montrer que la réponse UPR est un mécanisme adaptatif potentiel de l'uranium et du fluor, qui mérite d'être étudié plus avant à travers d'autres voies (ATF6 et PERK) et avec une cinétique complémentaire permettant d'étudier la séquence d'évènements.

**L'autophagie et la réponse UPR sont des mécanismes induits par l'uranium, tandis que seulement la réponse UPR est induite par le fluor dans nos conditions.**

**Aucun de ces deux mécanismes n'a pu être identifié comme un mécanisme adaptatif du fait que l'autophagie et la réponse UPR soient induites chez tous les animaux traités, qu'ils aient reçu une exposition prime ou non.**

**L'étude des autres voies impliquées dans la réponse UPR (notamment ATF6 et PERK) et de leur activation post-traductionnelle est une piste qu'il reste à explorer.**

De nombreux agents chimiques ayant la propriété d'altérer la signalisation calcique peuvent induire une activation de la réponse UPR dans différents modèles (Kitamura 2008; La Rovere et al. 2016). Or, l'uranium est capable d'inhiber les transporteurs du calcium et les ions uranyles peuvent se lier avec le calcium à la surface des os (Desmedt et al. 1993; Thompson and Nechay 1981). Du fait de ses propriétés chimiques et de sa forte électronégativité, le fluor a également été identifié comme un agent toxique capable d'altérer la voie calcique (Santoyo-Sanchez et al. 2013). Par conséquent, il pourrait exister une corrélation commune à l'uranium et au fluor entre cette interaction avec la voie calcique et le fait d'induire la réponse UPR.

L'autophagie et la réponse UPR pourraient être activées en amont de notre temps d'analyse (6 mois) dans la réponse adaptative à l'uranium et au fluor, tel qu'observé dans d'autres études avec différents stressseurs. Il est également possible que les effets induits par l'exposition prime soient



trop fins pour être détectés après le traitement challenge ou que ces derniers nécessitent un certain délai post-exposition pour être décelables. Afin de vérifier ces hypothèses, un protocole similaire au notre pourrait être réalisé, mais avec une cinétique comprenant plusieurs temps, notamment durant l'exposition chronique (sans injection challenge) ou après une période de latence entre exposition chronique et aiguë.

Il est intéressant de constater qu'une activation prolongée de l'autophagie et/ou de la réponse UPR peut être délétère, avec notamment l'induction de l'apoptose en aval (Gueguen et al. 2019; Kitamura 2008). L'autophagie est un mécanisme de défense cellulaire, permettant de réduire l'apoptose et de prolonger la survie cellulaire. Cependant, une induction trop intense ou prolongée de cette voie épuise le système cellulaire en le privant de ces organites ou de protéines essentielles au maintien de l'homéostasie cellulaire, pour finalement induire une apoptose caspase-indépendante (Scarlati et al. 2009). Un stress prolongé du RE peut également mener à l'apoptose (Kaufman 2002), notamment par une activation prolongée et excessive de la protéine CHOP. L'activation des caspases 12 et 3, induite par un stress du RE, a été mise en évidence dans des cellules rénales après 18 heures de traitement à l'uranium. Il est possible que ces mécanismes aient été induits durant nos expositions primes, mais de manière transitoire. Si ces mécanismes sont effectivement induits lors de l'exposition prime, on peut alors supposer qu'une exposition plus longue (supérieure à 6 mois) induise des effets délétères dans le rein avec notamment une induction de la mort programmée des cellules rénales.

**L'autophagie et la réponse UPR sont des mécanismes adaptatifs connus dans le cas d'exposition à d'autres agents chimiques ou radiologiques, mais dont l'activation peut être transitoire ou bien délétère si prolongée. C'est pourquoi une cinétique d'étude serait essentielle afin de comprendre leur potentielle implication dans la réponse adaptative à de faibles concentrations d'uranium ou de fluor.**

Une étude précédente du laboratoire a démontré qu'une contamination chronique de 9 mois de 1 à 600 mg/L d'uranium n'induisait aucune néphrotoxicité, mais augmentait le taux de glutathion dans le tissu rénal (Poisson et al. 2014). Ces résultats laissent donc supposer que la réponse antioxydante pourrait faire partie des mécanismes impliqués dans la réponse adaptative à l'uranium. Par ailleurs, l'expression génique de Nrf2 et de GSTA1 est induite chez les animaux pré-exposés à 50 mg/L de fluor en comparaison aux souris non traitées ou recevant la dose challenge seule. La concentration de 50 mg/L étant la dose à laquelle on observe une réponse adaptative, on peut supposer que l'activation de ces voies antioxydantes fasse partie des mécanismes adaptatifs mis en place dans la cellule rénale après une exposition chronique au fluor. Le fluor peut induire un stress oxydatif rénal après une exposition chronique entre 25 et 200 mg/L chez les rongeurs, avec notamment une élévation des ERO et des TBARS et une diminution du taux de GSH et des activités des enzymes antioxydantes SOD, CAT et GPX (Guan et al. 2000; Mittal and Flora 2006; Ranjan et al. 2009; Shanthakumari et al. 2004). Les données de la littérature sont controversées puisque Ranjan *et al.* ont observé une induction du stress oxydatif aux doses de 100 et 200 mg/L, mais pas après une exposition à 50 mg/L pendant 90 jours, tandis que Guan *et al.* ont observé une augmentation du



taux de MDA après une exposition de 7 mois à 30 mg/L de NaF. Après une exposition à une concentration plus faible de fluor (15 mg/L) durant 30 jours, une augmentation de l'activité de la GST est observée dans le rein de souris, indiquant l'activation d'une défense antioxydante (Chattopadhyay et al. 2011). Par conséquent, en complément de nos analyses moléculaires, il serait intéressant d'étudier la balance pro-/antioxydante au niveau protéique et enzymatique, ainsi que l'activation de la voie moléculaire Nrf2.

La voie Nrf2 est principalement connue pour son rôle dans la réponse au stress oxydatif. Il a été démontré que son activation peut réduire une inflammation et un dysfonctionnement rénal (Shao et al. 2014; Xing et al. 2012). Une augmentation de l'expression de Nrf2 est corrélée à la réduction du taux de la cytokine pro-inflammatoire TNF- $\alpha$ . Or, lors de nos contaminations chroniques au fluor, nous observons une diminution de l'expression des protéines impliquées dans le recrutement des cellules inflammatoires, indicateur d'une diminution de l'inflammation. De plus, l'induction de l'expression génique de Nrf2 chez les souris pré-exposée à 50 mg/L de fluor nous permet de faire l'hypothèse que Nrf2 pourrait être impliquée dans la réponse adaptative et dans la régulation de l'inflammation observées après contamination chronique au fluor. L'activation de la voie moléculaire de Nrf2 joue également un rôle dans la réduction de dommages à l'ADN, notamment dans la réponse adaptative aux rayonnements, avec une diminution du nombre de CDB à l'ADN induites par les RI (Khan et al. 2011; Mathew et al. 2014). La voie Nrf2 est activée lors de la production d'ERO, mais il a été démontré qu'elle pouvait également être induite par l'autophagie (DeNicola et al. 2011; Komatsu et al. 2010; Taguchi et al. 2012). Or, l'autophagie est un mécanisme induit par l'uranium dans nos conditions expérimentales. L'expression génique de Nrf2 a été étudiée et nous n'avons pas vu de modulation induite par les traitements à l'uranium, mais il serait intéressant d'étudier son activation à travers son expression protéique (translocation au noyau), ainsi que celle de Keap1.

Il a été démontré que dans un modèle de souris KO (knocked out) Nrf2<sup>-/-</sup>, la réponse adaptative rénale observée après une exposition à un toxique était supprimée (Joo et al. 2013). L'implication de la voie Nrf2 dans ce processus de compensation à faible dose a été étudiée précédemment au laboratoire sur des animaux déficients en Nrf2, *via* une exposition de souris Nrf2<sup>-/-</sup> à différentes concentrations d'uranium (entre 1 et 160 mg/L) (Poisson 2013). Une accumulation plus importante d'uranium a été observée dans les reins, le foie et les os chez ces animaux déficients pour Nrf2 par rapport aux animaux sauvages. Cette accumulation entraîne une augmentation des taux urinaires de plusieurs biomarqueurs de néphrotoxicité et d'inflammation (NGAL, OPN, B2MG et cys-C), ces variations étant accentuées chez les animaux déficients pour Nrf2. Il serait intéressant de poursuivre ces travaux afin de voir si les réponses adaptatives que nous observons à 20 mg/L d'uranium et 50 mg/L de fluor sont toujours induites dans un modèle dans lequel la voie Nrf2 est réprimée.

**Du fait de son rôle dans le stress oxydatif, l'inflammation et l'apoptose la voie Nrf2 représente une piste intéressante à étudier.**

**La reproduction de notre protocole chez un modèle de souris déficient pour Nrf2 nous permettrait d'identifier ou non cette voie comme un point clé dans la réponse adaptative mise en place lors d'une contamination chronique à l'uranium ou au fluor.**

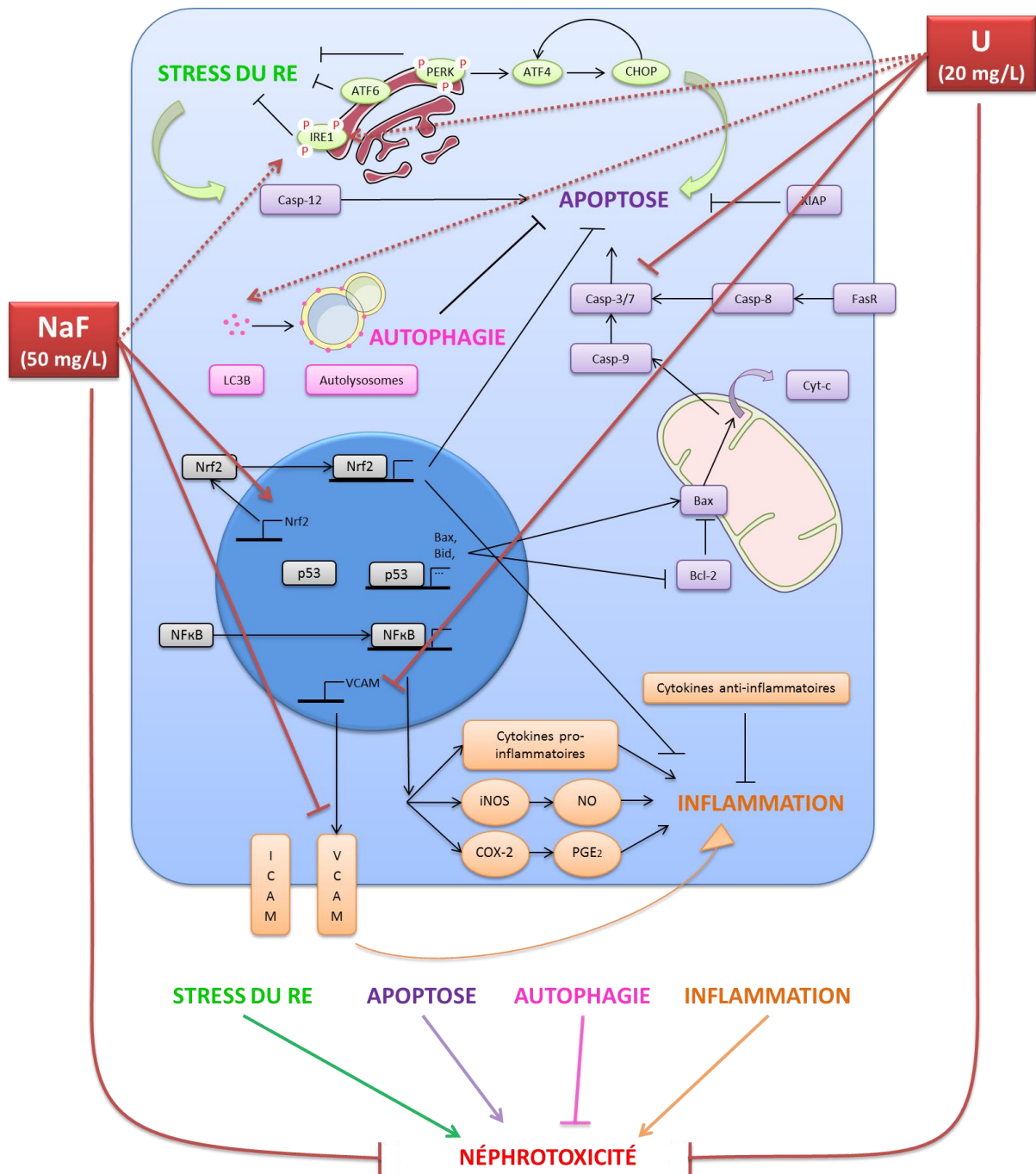


---

**CONCLUSION GÉNÉRALE**

---





**Figure 49 : Schéma résumant les mécanismes d'action de l'apoptose, l'inflammation, l'autophagie et de la réponse UPR ainsi que les résultats obtenus durant la thèse**

La figure représente les différents mécanismes connus dans la littérature comme étant impliqués dans l'adaptation et/ou dans la toxicité de l'uranium ou du fluor. Nos résultats obtenus lors du protocole d'exposition prime suivie d'un traitement challenge sont indiqués en rouge. Les traits pleins correspondent aux mécanismes adaptatifs mis en évidence, tandis que les traits en pointillés représentent les mécanismes induits par nos traitements, chez les animaux ayant été pré-exposés ou non. Ces mécanismes mènent à une diminution de la mortalité des cellules rénales, et à une diminution de la néphrotoxicité.

L'ensemble des résultats acquis au cours de cette thèse, associés aux données bibliographiques existantes sur les voies impliquées dans la réponse adaptative et dans la réponse à l'uranium et/ou au fluor, nous ont permis de dresser le schéma bilan présenté en **figure 49**.

Les travaux effectués durant cette thèse ont permis de dresser les conclusions suivantes :

- ✓ Une exposition chronique de 6 mois *per os* (20 mg/L d'uranium et 50 mg/L de fluor) induit une réponse adaptative rénale chez la souris mise en évidence par un traitement challenge, avec une diminution de l'expression de biomarqueurs rénaux tels que CLU et KIM-1.
- ✓ Cette réponse adaptative n'est pas observée aux autres concentrations testées, démontrant l'aspect dose-dépendant de la réponse adaptative rénale à l'uranium et au fluor.
- ✓ La régulation de l'apoptose a été identifiée comme l'un des mécanismes de la réponse adaptative induite par l'uranium (20 mg/L), avec notamment une diminution des activités caspases 3 et 7.
- ✓ La régulation du recrutement de cellules inflammatoires serait impliquée dans le mécanisme de la réponse adaptative induite par le fluor (50 mg/L), avec notamment une diminution de l'expression *in situ* de VCAM.
- ✓ La réponse UPR est un mécanisme cellulaire induit par l'uranium et le fluor, tandis que l'autophagie est uniquement induite par l'uranium, chez tous les animaux. Ces mécanismes ne peuvent donc pas être identifiés comme des mécanismes impliqués dans la réponse adaptative à ces substances.

La réponse adaptative, identifiée dans nos travaux de thèse, a permis de confirmer les hypothèses précédentes émises au laboratoire ainsi que dans de nombreux articles issus de la littérature. Cependant, nous avons pu constater que cette réponse n'est mise en évidence qu'à une concentration bien précise d'uranium ou de fluor. Il est possible qu'une exposition prime plus ou moins longue (inférieure ou supérieure à 6 mois), ou qu'un temps de latence entre l'exposition prime et le traitement challenge révèle une réponse adaptative à des concentrations différentes.

Les mécanismes cellulaires et moléculaires tels que l'apoptose, la régulation de l'inflammation, la réponse UPR et l'autophagie sont des mécanismes adaptatifs décrits dans la littérature dans le cas d'exposition à d'autres agents chimiques ou radiologiques, mais dont l'activation peut être transitoire. Afin de compléter ces connaissances, un protocole similaire au nôtre pourrait être réalisé avec une étude cinétique comprenant plusieurs temps, notamment durant notre exposition prime



afin de voir si la réponse UPR et l'autophagie sont induites lors de l'exposition chronique à faible dose. De plus, l'étude d'autres voies impliquées dans la réponse UPR (notamment ATF6 et PERK) et de leur activation post-traductionnelle permettrait de mieux identifier ce mécanisme induit par l'uranium et le fluor.

Durant nos travaux, nous avons étudié l'apoptose à travers l'activité enzymatique des caspases effectrices 3 et 7. Afin de connaître plus en détail les voies d'activation de l'apoptose des analyses supplémentaires pourraient être effectuées par la suite, avec notamment l'étude de l'activation de CHOP, XIAP et des caspases 12, 8 et 9, qui sont connues en tant que protéines activées par un traitement à l'uranium et/ou au fluor. La réponse inflammatoire, *via* l'analyse des molécules CAM, n'a pas été identifiée comme un mécanisme adaptatif mis en place en réponse à l'uranium dans nos conditions. Cependant, il serait intéressant d'investiguer plus en détail cette voie, avec notamment des dosages des sécrétions de cytokines pro- et anti-inflammatoires, ainsi que d'iNOS et de COX-2 puisque ces dernières peuvent être induites lors d'une exposition aiguë à l'uranium et au fluor. Ces mécanismes cellulaires de la réponse adaptative sont guidés par différentes voies moléculaires, tel que décrit dans nos revues d'introduction. Parmi ces voies, p53, NFκB et Nrf2 paraissent les plus susceptibles d'être impliquées dans la réponse adaptative à l'uranium ou au fluor. La réalisation d'un protocole de réponse adaptative similaire au nôtre chez un modèle de souris déficient pour l'une de ces voies, notamment Nrf2, nous permettrait d'identifier ou non cette dernière comme un point clé dans la réponse adaptative mise en place.

Il est connu qu'une activation prolongée de l'autophagie et de la réponse UPR peut être néfaste pour les cellules. Donc si ces mécanismes sont induits lors de l'exposition prime, il serait intéressant de prolonger notre exposition chronique afin de voir si des effets délétères surviennent dans les cellules rénales durant cette période, notamment une potentielle induction de l'apoptose.

Ces résultats permettent d'avoir une meilleure compréhension des mécanismes d'action de l'uranium et du fluor lors d'exposition chroniques à de faibles doses. Ce travail de thèse ouvre par ailleurs une perspective intéressante quant aux effets d'une co-exposition à l'uranium et au fluor dans le rein, puisque ces deux substances sont retrouvées dans notre alimentation quotidienne.



---

**VALORISATIONS**

---



## I. Publications

### Articles

**In vivo comparison between two nephrotoxic agents, sodium fluoride and uranyl nitrate: phenotypic aspects and molecular mechanisms involved.**

A. Bontemps, L. Conquet, C. Elie, V. Magneron, C. Gloaguen, D. Kereselidze, K. Tack, O. C. Barbier, Y. Guéguen. *Int. J. Environ. Res. Public Health* (2019).

**Renal adaptive response to chronic uranyl nitrate and sodium fluoride exposures in mice.**

A. Bontemps-Karcher, V. Magneron, L. Conquet, C. Elie, C. Gloaguen, D. Kereselidze, L. Roy, O. C. Barbier, Y. Guéguen. *À soumettre dans Toxicology and Applied Pharmacology*

### Revues

**Adaptive responses to low doses of radiation or chemicals: their cellular and molecular mechanisms.**

Y. Guéguen, A. Bontemps, T. Ebrahimian. *Cell. Mol. Life Sci.* (2018).

**Adverse outcome pathways for uranium-induced kidney toxicity.**

A. Bontemps-Karcher, Y. Guéguen. *À soumettre*





## II. Communications orales et affichées

### Communications 2017

**Étude de la réponse adaptative au niveau rénal après exposition chronique à de faibles concentrations d'uranium ou de fluor.**

Journée des thèses IRSN - Carry-le-Rouet - *Communication affichée (Bontemps A. et al.)*

Journée des thèses de l'ED569 - Chatenay Malabry - *Communication affichée (Bontemps A. et al.)*

### Communications 2018

**Étude de la réponse adaptative au niveau rénal après exposition chronique à de faibles concentrations d'uranium ou de fluor.**

Journée des thèses IRSN – Annecy - *Communication orale (Bontemps A. et al.)*

**Low Dose External  $\gamma$  Ionizing Radiation Regulates Mouse Immune Cells in a Dose and Dose-rate- Dependent Manner.**

Congrès international – Toronto (Canada) - *Co-auteur sur communications affichées (Ebrahimian. T.G et al.)*

**In vivo comparison between two nephrotoxic agents, sodium fluoride and uranyl nitrate: phenotypic aspects and molecular mechanisms involved.**

Congrès EUROTOX – Bruxelles (Belgique) - *Communication affichée (Bontemps A. et al.)*

Congrès international HEIR – Fontenay-Aux-Roses (France) - *Communication orale (Bontemps A. et al.)*



---

**ANNEXES**

---



**Annexe I : Les différentes étapes du déparaffinage et de la coloration  
à l'hématoxyline-éosine-safran**

Étapes	Solution	Temps
Déparaffinage	Xylène	3 minutes
	Xylène	3 minutes
	Ethanol 100°	3 minutes
	Ethanol 95°	3 minutes
	Ethanol 80°	3 minutes
Coloration HES	Lavage	3 minutes
	Hemalun	5 minutes
	Lavage	3 minutes
	Ethanol HCl 1%	2 secondes
	Lavage	3 minutes
	Carbonate de lithium	1 minute
	Lavage	3 minutes
	Erythrosine	1 minute
	Lavage	3 minutes
	Ethanol 100°	1 minute
	Ethanol 100°	1 minute
	Safran	15 minutes
	Ethanol 100°	30 secondes
	Ethanol 100°	30 secondes
	Ethanol 100°	3 minutes
	Ethanol 100°	3 minutes
	Xylène	3 minutes
	Xylène	3 minutes



## Annexe II : Score histologique des différentes lésions rénales

Lésions rénales	Scores
<b>Atteinte glomérulaire</b>	
<b>Glomérulosclérose</b>	
Non détectable	0
Prolifération mésangiale et/ou sclérose dans quelques glomérules (minimal)	1
Prolifération mésangiale et/ou sclérose dans < 20% des glomérules (léger)	2
Prolifération mésangiale et/ou sclérose dans 20-50% des glomérules (modéré)	3
Prolifération mésangiale et/ou sclérose dans > 50% des glomérules (sévère)	4
<b>Dilatation cystique glomérulaire</b>	
Non détectable	0
< 3 par champs (minimal)	1
3-5 par champs (léger)	2
6-10 par champs (modéré)	3
> 10 par champs (sévère)	4
<b>Atteinte tubulaire et interstitielle</b>	
<b>Nécrose tubulaire</b>	
Non détectable	0
Nécrose d'un tubule (minimal)	1
Nécrose de < 20% des tubules (léger)	2
Nécrose de 20-50% des tubules (modéré)	3
Nécrose de > 50% des tubules (sévère)	4
<b>Régénération tubulaire</b>	
Non détectable	0
Rares foyers de régénération (minimal)	1
Quelques foyers de régénération (léger)	2
Plusieurs foyers de régénération (modéré)	3
De nombreux foyers de régénération (sévère)	4
<b>Dilatation tubulaire / dépôts hyalins</b>	
Non détectable	0
Occasionnel (minimal)	1
Dilatation de < 20% des tubules (léger)	2
Dilatation de 20-50% des tubules (modéré)	3
Dilatation de > 50% des tubules (sévère)	4
<b>Inflammation interstitielle</b>	
Non détectable	0
Minimale	1
Légère	2
Modérée	3
Sévère	4
<b>Fibrose interstitielle</b>	
Non détectable	0
Quelques foyers de fibrose péri-tubulaire ou péri-glomérulaire (minimal)	1
Fibrose dans < 20% du parenchyme rénal (léger)	2
Fibrose dans 20-50% du parenchyme rénal (modéré)	3
Fibrose dans > 50% du parenchyme rénal (sévère)	4





**Annexe III : Références des produits utilisés lors des immunomarquages**

Produit	Référence	Fournisseur
Tampon citrate pH=6	S1699	DAKO, Les Ulis, France
Solution de lavage	S3006	DAKO, Les Ulis, France
Solution de blocage	X0909	DAKO, Les Ulis, France
Anticorps primaire Lapin anti-KIM-1	ab47635	abcam, Cambridge, UK
Anticorps primaire Lapin anti-LC3-II	ab192890	abcam, Cambridge, UK
Anticorps primaire Lapin anti-IRE1- $\alpha$	NB100-2323	R&D Systems, Bio-Techne, Lille, France
Anticorps primaire Rat anti-ICAM	ab119871	abcam, Cambridge, UK
Anticorps primaire Lapin anti-VCAM	ab134047	abcam, Cambridge, UK
Anticorps primaire Lapin anti- $\gamma$ -H <sub>2</sub> AX	ab81299	abcam, Cambridge, UK
Anticorps secondaire Alexa Fluor chèvre anti-lapin	ab150061	abcam, Cambridge, UK
Anticorps secondaire N-histofine anti-rat	HRP F/414311F	MM France, Brignais, France
Anticorps secondaire N-histofine anti-lapin	HRP F/414341F	MM France, Brignais, France
Solution de dilution des anticorps DAKO	S3022	DAKO, Les Ulis, France
Milieu de montage Vectashieldantifademounting medium	H-1000	Eurobio Scientific, Les Ulis, France
Solution de révélation DAB QUANTO	F/TA-060-QHD	MM France, Brignais, France

**Annexe IV : Étapes du déparaffinage dans l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et dans le triton X-100**

Déparaffinage H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	
Solution	Temps (minutes)
Xylène	3
Xylène	3
Ethanol 100°	3
Ethanol 95°	3
Ethanol 80°	3
Lavage	10
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3%	10
Lavage	10



---

**BIBLIOGRAPHIE**

---



## BIBLIOGRAPHIE

---

- (2018) CRC Handbook of chemistry and physics, 99th edn. CRC Press, Cleveland, Ohio, US
- Abromson-Leeman S, Hayashi M, Martin C, Sobel R, al-Sabbagh A, Weiner H, Dorf ME (1993) T cell responses to myelin basic protein in experimental autoimmune encephalomyelitis-resistant BALB/c mice. *Journal of neuroimmunology* 45:89-101
- AFSSA. (2010) Avis de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments relatif à la détermination d'une exigence de qualité en uranium pondéral dans les eaux destinées à la consommation humaine. Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, Maison-Alfort, France
- Agalakova NI, Gusev GP (2013) Transient activation of protein kinase C contributes to fluoride-induced apoptosis of rat erythrocytes. *Toxicol In Vitro* 27:2335-2341
- Ajrouch R, Roudier C, Clero E, Ielsch G, Gay D, Guillevic J, Marant Micallef C, Vacquier B, Le Tertre A, Laurier D (2018) Quantitative health impact of indoor radon in France. *Radiation and environmental biophysics* 57:205-214
- Akçay A, Nguyen Q, Edelstein CL (2009) Mediators of inflammation in acute kidney injury. *Mediators of inflammation* 2009:137072
- Albanese R (1987) Sodium fluoride and chromosome damage (in vitro human lymphocyte and in vivo micronucleus assays). *Mutagenesis* 2:497-499
- Anderson NG, Kilgour E, Sturgill TW (1991) Activation of mitogen-activated protein kinase in BC3H1 myocytes by fluoroaluminate. *The Journal of biological chemistry* 266:10131-10135
- Angenard G, Muczynski V, Coffigny H, Duquenne C, Frydman R, Habert R, Livera G, Rouiller-Fabre V (2011) In vitro effects of Uranium on human fetal germ cells. *Reprod Toxicol* 31:470-476
- Anke M, Seeber O, Müller R, Schäfer U, Zerull J (2009) Uranium transfer in the food chain from soil to plants, animals and man. *Chemie der Erde* 2:75-90
- Ansoborlo E, Prat O, Moisy P, Den Auwer C, Guilbaud P, Carriere M, Gouget B, Duffield J, Doizi D, Vercoüter T, Moulin C, Moulin V (2006) Actinide speciation in relation to biological processes. *Biochimie* 88:1605-1618
- Archer VE, Wagoner JK, Lundin FE, Jr. (1973) Cancer mortality among uranium mill workers. *Journal of occupational medicine : official publication of the Industrial Medical Association* 15:11-14
- Arnault E, Doussau M, Pesty A, Gouget B, Van der Meeren A, Fouchet P, Lefevre B (2008) Natural uranium disturbs mouse folliculogenesis in vivo and oocyte meiosis in vitro. *Toxicology* 247:80-87
- Arzuaga X, Gehlhaus M, Strong J (2015) Modes of action associated with uranium induced adverse effects in bone function and development. *Toxicology letters* 236:123-130
- Asic A, Kurtovic-Kozaric A, Besic L, Mehinovic L, Hasic A, Kozaric M, Hukic M, Marjanovic D (2017) Chemical toxicity and radioactivity of depleted uranium: The evidence from in vivo and in vitro studies. *Environ Res* 156:665-673
- ASN., DGS., IRSN. (2011) La qualité radiologique de l'eau du robinet en France 2008-2009. Autorité de Sécurité Nucléaire  
Direction Générale de la Santé  
Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire
- ATSDR (2013) Toxicological profile for uranium. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, Georgia, U.S.
- ATSDR. (2003) Toxicological profile for fluorides, hydrogen fluoride, and fluorine. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, Georgia, US
- Aulitzky WK, Schlegel PN, Wu DF, Cheng CY, Chen CL, Li PS, Goldstein M, Reidenberg M, Bardin CW (1992) Measurement of urinary clusterin as an index of nephrotoxicity. *Proc Soc Exp Biol Med* 199:93-96
- Bacchetta J, Dubourg L, Juillard L, Cochat P (2009) Non-drug-induced nephrotoxicity. *Pediatr Nephrol* 24:2291-2300
- Bagshaw SM, Langenberg C, Haase M, Wan L, May CN, Bellomo R (2007) Urinary biomarkers in septic acute kidney injury. *Intensive care medicine* 33:1285-1296

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Bai XC, Lu D, Bai J, Zheng H, Ke ZY, Li XM, Luo SQ (2004) Oxidative stress inhibits osteoblastic differentiation of bone cells by ERK and NF-kappaB. *Biochemical and biophysical research communications* 314:197-207
- Banday AA, Priyamvada S, Farooq N, Yusufi AN, Khan F (2008) Effect of uranyl nitrate on enzymes of carbohydrate metabolism and brush border membrane in different kidney tissues. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 46:2080-2088
- Bao Y, Wang D, Li Z, Hu Y, Xu A, Wang Q, Shao C, Chen H (2013) Efficacy of a novel chelator BPCBG for removing uranium and protecting against uranium-induced renal cell damage in rats and HK-2 cells. *Toxicology and applied pharmacology* 269:17-24
- Barber DS, Hancock SK, McNally AM, Hinckley J, Binder E, Zimmerman K, Ehrich MF, Jortner BS (2007) Neurological effects of acute uranium exposure with and without stress. *Neurotoxicology* 28:1110-1119
- Barbier O, Arreola-Mendoza L, Del Razo LM (2010) Molecular mechanisms of fluoride toxicity. *Chem Biol Interact* 188:319-333
- Basha PM, Rai P, Begum S (2011) Fluoride toxicity and status of serum thyroid hormones, brain histopathology, and learning memory in rats: a multigenerational assessment. *Biological trace element research* 144:1083-1094
- Basha PM, Saumya SM (2013) Suppression of mitochondrial oxidative phosphorylation and TCA enzymes in discrete brain regions of mice exposed to high fluoride: amelioration by Panax ginseng (Ginseng) and Lagerstroemia speciosa (Banaba) extracts. *Cellular and molecular neurobiology* 33:453-464
- Bassin EB, Wypij D, Davis RB, Mittleman MA (2006) Age-specific fluoride exposure in drinking water and osteosarcoma (United States). *Cancer causes & control : CCC* 17:421-428
- Belcher JM, Sanyal AJ, Peixoto AJ, Perazella MA, Lim J, Thiessen-Philbrook H, Ansari N, Coca SG, Garcia-Tsao G, Parikh CR (2014) Kidney biomarkers and differential diagnosis of patients with cirrhosis and acute kidney injury. *Hepatology* 60:622-632
- Bellomo R, Ronco C, Kellum JA, Mehta RL, Palevsky P (2004) Acute renal failure - definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *Crit Care* 8:R204-212
- Bennett MR, Devarajan P (2017) Characteristics of an ideal biomarker of kidney diseases. In: Edelstein CL (ed) *Biomarkers of kidney disease*, II edn, pp 1-20
- Bharti VK, Srivastava RS (2009) Fluoride-induced oxidative stress in rat's brain and its amelioration by buffalo (*Bubalus bubalis*) pineal proteins and melatonin. *Biological trace element research* 130:131-140
- Bhowmik AD, Chattopadhyay A (2019) A review on fluoride induced organotoxicity and genotoxicity in mammals and zebrafish. *Nucleus* 62:177-185
- Bigazzi PE (1999) Metals and kidney autoimmunity. *Environ Health Perspect* 107 Suppl 5:753-765
- Bindels RJ, Hartog A, Timmermans JA, van Os CH (1991) Immunocytochemical localization of calbindin-D28k, calbindin-D9k and parvalbumin in rat kidney. *Contributions to nephrology* 91:7-13
- Blakey K, Feltbower RG, Parslow RC, James PW, Gomez Pozo B, Stiller C, Vincent TJ, Norman P, McKinney PA, Murphy MF, Craft AW, McNally RJ (2014) Is fluoride a risk factor for bone cancer? Small area analysis of osteosarcoma and Ewing sarcoma diagnosed among 0-49-year-olds in Great Britain, 1980-2005. *International journal of epidemiology* 43:224-234
- Blaszczyk I, Grucka-Mamczar E, Kasperczyk S, Birkner E (2009) Influence of methionine upon the concentration of malondialdehyde in the tissues and blood of rats exposed to sodium fluoride. *Biological trace element research* 129:229-238

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Bohatyrewicz M, Urasinska E, Rozanski J, Ciechanowski K (2007) Membranous glomerulonephritis may be associated with heavy marijuana abuse. *Transplantation proceedings* 39:3054-3056
- Boice JD, Jr., Cohen SS, Mumma MT, Chadda B, Blot WJ (2008) A cohort study of uranium millers and miners of Grants, New Mexico, 1979-2005. *Journal of radiological protection : official journal of the Society for Radiological Protection* 28:303-325
- Boice JD, Jr., Ellis ED, Golden AP, Girardi DJ, Cohen SS, Chen H, Mumma MT, Shore RE, Leggett RW (2018) The Past Informs the Future: An Overview of the Million Worker Study and the Mallinckrodt Chemical Works Cohort. *Health physics* 114:381-385
- Bontemps A, Conquet L, Elie C, Magneron V, Gloaguen C, Kereselidze D, Tack K, Barbier OC, Gueguen Y (2019) In Vivo Comparison of the Phenotypic Aspects and Molecular Mechanisms of Two Nephrotoxic Agents, Sodium Fluoride and Uranyl Nitrate. *International journal of environmental research and public health* 16
- Bourgeois D, Burt-Pichat B, Le Goff X, Garrevoet J, Tack P, Falkenberg G, Van Hoorebeke L, Vincze L, Denecke MA, Meyer D, Vidaud C, Boivin G (2015) Micro-distribution of uranium in bone after contamination: new insight into its mechanism of accumulation into bone tissue. *Analytical and bioanalytical chemistry* 407:6619-6625
- Brindha K, Elango L (2011) Fluoride in groundwater: causes, implications and mitigation measures. In: Monroy SD (ed) *Fluoride properties, applications and environmental management*, 1 edn. Nova, pp 111-136
- Briner W, Murray J (2005) Effects of short-term and long-term depleted uranium exposure on open-field behavior and brain lipid oxidation in rats. *Neurotoxicol Teratol* 27:135-144
- Brooks CR, Yeung MY, Brooks YS, Chen H, Ichimura T, Henderson JM, Bonventre JV (2015) KIM-1/TIM-1-mediated phagocytosis links ATG5-/ULK1-dependent clearance of apoptotic cells to antigen presentation. *The EMBO journal* 34:2441-2464
- Buzalaf MAR, Whitford GM (2011) Fluoride metabolism. *Monographs in oral science* 22:20-36
- Caillard S, Moulin B (2003) Drug-induced acute interstitial nephritis. *Réanimation* 12:306-312
- Calabrese EJ, Baldwin LA (2001) The frequency of U-shaped dose responses in the toxicological literature. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 62:330-338
- Calabrese EJ, Baldwin LA (2003) Hormesis: the dose-response revolution. *Annual review of pharmacology and toxicology* 43:175-197
- Cantone L, Nordio F, Hou L, Apostoli P, Bonzini M, Tarantini L, Angelici L, Bollati V, Zanobetti A, Schwartz J, Bertazzi PA, Baccarelli A (2011) Inhalable metal-rich air particles and histone H3K4 dimethylation and H3K9 acetylation in a cross-sectional study of steel workers. *Environ Health Perspect* 119:964-969
- Cardenas-Gonzalez M, Jacobo Estrada T, Rodriguez-Munoz R, Barrera-Chimal J, Bobadilla NA, Barbier OC, Del Razo LM (2016) Sub-chronic exposure to fluoride impacts the response to a subsequent nephrotoxic treatment with gentamicin. *J Appl Toxicol* 36:309-319
- Cardenas-Gonzalez MC, Del Razo LM, Barrera-Chimal J, Jacobo-Estrada T, Lopez-Bayghen E, Bobadilla NA, Barbier O (2013) Proximal renal tubular injury in rats sub-chronically exposed to low fluoride concentrations. *Toxicology and applied pharmacology* 272:888-894
- Carmona A, Malard V, Avazeri E, Roudeau S, Porcaro F, Paredes E, Vidaud C, Bresson C, Ortega R (2018) Uranium exposure of human dopaminergic cells results in low cytotoxicity, accumulation within sub-cytoplasmic regions, and down regulation of MAO-B. *Neurotoxicology* 68:177-188
- Cerda J, Lameire N, Eggers P, Pannu N, Uchino S, Wang H, Bagga A, Levin A (2008) Epidemiology of acute kidney injury. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 3:881-886
- Chakrabarti A, Chen AW, Varner JD (2011) A review of the mammalian unfolded protein response. *Biotechnology and bioengineering* 108:2777-2793
- Chattopadhyay A, Podder S, Agarwal S, Bhattacharya S (2011) Fluoride-induced histopathology and synthesis of stress protein in liver and kidney of mice. *Arch Toxicol* 85:327-335



## BIBLIOGRAPHIE

---

- Checkoway H, Pearce N, Crawford-Brown DJ, Cragle DL (1988) Radiation doses and cause-specific mortality among workers at a nuclear materials fabrication plant. *American journal of epidemiology* 127:255-266
- Chen R, Zhao LD, Liu H, Li HH, Ren C, Zhang P, Guo KT, Zhang HX, Geng DQ, Zhang CY (2017) Fluoride Induces Neuroinflammation and Alters Wnt Signaling Pathway in BV2 Microglial Cells. *Inflammation* 40:1123-1130
- Chen S, Pan X (2016) The effects of fluoride on hypermethylation, transcription and expression of p16 gene in osteoblasts of rat 35:33-37
- Chew SL, Lins RL, Daelemans R, Nuyts GD, De Broe ME (1993) Urinary enzymes in acute renal failure. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 8:507-511
- Chinoy NJ, Sharma A (1998) Amelioration of fluoride toxicity by vitamins E and D in reproductive functions of male mice. *Fluoride* 31:203-216
- Chouhan S, Flora SJ (2008) Effects of fluoride on the tissue oxidative stress and apoptosis in rats: biochemical assays supported by IR spectroscopy data. *Toxicology* 254:61-67
- Chung HJ, Lee MG (2006) Pharmacokinetic changes of ipriflavone in rats with acute renal failure induced by uranyl nitrate. *Biopharmaceutics & drug disposition* 27:345-351
- Chung WK, E. J.; Lee, I.; Kim, S. G.; Lee, M. G.; Kim, S. H. (2003) Effects of recombinant human growth hormone on the pharmacokinetics of intravenous chlorzoxazone in rats with acute renal failure induced by uranyl nitrate. *Life sciences* 73:253-263
- Cittanova ML, Estepa L, Bourbouze R, Blanc O, Verpont MC, Wahbe E, Coriat P, Daudon M, Ronco PM (2002) Fluoride ion toxicity in rabbit kidney thick ascending limb cells. *European journal of anaesthesiology* 19:341-349
- Cittanova ML, Lelongt B, Verpont MC, Geniteau-Legendre M, Wahbe F, Prie D, Coriat P, Ronco PM (1996) Fluoride ion toxicity in human kidney collecting duct cells. *Anesthesiology* 84:428-435
- Collings GH, Jr., Fleming RB, May R, Bianconi WO (1952) Absorption and excretion of inhaled fluorides; further observations. *AMA archives of industrial hygiene and occupational medicine* 6:368-373
- Comber H, Deady S, Montgomery E, Gavin A (2011) Drinking water fluoridation and osteosarcoma incidence on the island of Ireland. *Cancer causes & control : CCC* 22:919-924
- Cooper RG (2006) Effect of tobacco smoking on renal function. *The Indian journal of medical research* 124:261-268
- Correa-Rotter R, Ibarra-Rubio ME, Schwochau G, Cruz C, Silkensen JR, Pedraza-Chaverri J, Chmielewski D, Rosenberg ME (1998) Induction of clusterin in tubules of nephrotic rats. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 9:33-37
- Craft E, Abu-Qare A, Flaherty M, Garofolo M, Rincavage H, Abou-Donia M (2004) Depleted and natural uranium: chemistry and toxicological effects. *Journal of toxicology and environmental health Part B, Critical reviews* 7:297-317
- Cragle DL, McLain RW, Qualters JR, Hickey JL, Wilkinson GS, Tankersley WG, Lushbaugh CC (1988) Mortality among workers at a nuclear fuels production facility. *American journal of industrial medicine* 14:379-401
- Cremer HD, Buttner W (1970) Absorption of fluorides. *Monograph series World Health Organization* 59:75-91
- Cronin SJ, Neall VE, Lecointre JA, Hedley MJ, Loganathan P (2003) Environmental hazards of fluoride in volcanic ash: a case study from Ruapehu volcano, New Zealand *J Volcanol Geotherm Res* 121:271-291
- Cybulsky AV (2017) Endoplasmic reticulum stress, the unfolded protein response and autophagy in kidney diseases. *Nature reviews Nephrology* 13:681-696
- Czarnowski W, Wrzesniowska K, Krechniak J (1996) Fluoride in drinking water and human urine in northern and central Poland. *The Science of the total environment* 191:177-184

## BIBLIOGRAPHIE

---

- D'Amico G, Bazzi C (2003) Urinary protein and enzyme excretion as markers of tubular damage. *Current opinion in nephrology and hypertension* 12:639-643
- Daiwile AP, Sivanesan S, Tarale P, Naoghare PK, Bafana A, Parmar D, Kannan K (2018) Role of fluoride induced histone trimethylation in development of skeletal fluorosis. *Environmental toxicology and pharmacology* 57:159-165
- Daiwile AP, Tarale P, Sivanesan S, Naoghare PK, Bafana A, Parmar D, Kannan K (2019) Role of fluoride induced epigenetic alterations in the development of skeletal fluorosis. *Ecotoxicology and environmental safety* 169:410-417
- Danesi PR, Markowicz A, Chinea-Cano E, Burkart W, Salbu B, Donohue D, Ruedenauer F, Hedberg M, Vogt S, Zahradnik P, Ciurapinski A (2003) Depleted uranium particles in selected Kosovo samples. *Journal of environmental radioactivity* 64:143-154
- Darolles C, Broggio D, Feugier A, Frelon S, Dublineau I, De Meo M, Petitot F (2010) Different genotoxic profiles between depleted and enriched uranium. *Toxicology letters* 192:337-348
- Daudon M, Jungers P (2004) Drug-induced renal calculi: epidemiology, prevention and management. *Drugs* 64:245-275
- de Jong PE, Curhan GC (2006) Screening, monitoring, and treatment of albuminuria: public health perspectives. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 17:2120-2126
- Dean HT (2006) Endemic fluorosis and its relation to dental caries. 1938. *Public Health Rep* 121 Suppl 1:213-219; discussion 212
- Dec K, Lukomska A, Skonieczna-Zydecka K, Kolasa-Wolosiuk A, Tarnowski M, Baranowska-Bosiacka I, Gutowska I (2019) Long-term exposure to fluoride as a factor promoting changes in the expression and activity of cyclooxygenases (COX1 and COX2) in various rat brain structures. *Neurotoxicology* 74:81-90
- Dedieu A, Berenguer F, Basset C, Prat O, Quemeneur E, Pible O, Vidaud C (2009) Identification of uranyl binding proteins from human kidney-2 cell extracts by immobilized uranyl affinity chromatography and mass spectrometry. *Journal of chromatography A* 1216:5365-5376
- DenBesten P, Li W (2011) Chronic fluoride toxicity: dental fluorosis. *Monographs in oral science* 22:81-96
- Deng H, Kuang P, Cui H, Chen L, Luo Q, Fang J, Zuo Z, Deng J, Wang X, Zhao L (2016) Sodium fluoride (NaF) induces the splenic apoptosis via endoplasmic reticulum (ER) stress pathway in vivo and in vitro. *Aging* 8:3552-3567
- DeNicola GM, Karreth FA, Humpton TJ, Gopinathan A, Wei C, Frese K, Mangal D, Yu KH, Yeo CJ, Calhoun ES, Scrimieri F, Winter JM, Hruban RH, Iacobuzio-Donahue C, Kern SE, Blair IA, Tuveson DA (2011) Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. *Nature* 475:106-109
- Desmedt L, Simaels J, Van Driessche W (1993) Ca(2+)-blockable, poorly selective cation channels in the apical membrane of amphibian epithelia. UO<sub>2</sub>(2+) reveals two channel types. *The Journal of general physiology* 101:85-102
- Dhar V, Bhatnagar M (2009) Physiology and toxicity of fluoride. *Indian journal of dental research : official publication of Indian Society for Dental Research* 20:350-355
- Di Lella LA, Nannoni F, Protano G, Riccobono F (2005) Uranium contents and (235)U/(238)U atom ratios in soil and earthworms in western Kosovo after the 1999 war. *The Science of the total environment* 337:109-118
- Diamond GL, Morrow PE, Panner BJ, Gelein RM, Baggs RB (1989) Reversible uranyl fluoride nephrotoxicity in the Long Evans rat. *Fundamental and applied toxicology : official journal of the Society of Toxicology* 13:65-78
- Diaz Sylvester PL, Lopez R, Ubios AM, Cabrini RL (2002) Exposure to subcutaneously implanted uranium dioxide impairs bone formation. *Archives of environmental health* 57:320-325

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Die L, Yan P, Jun Jiang Z, Min Hua T, Cai W, Xing L (2012) Glycogen synthase kinase-3 beta inhibitor suppresses *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide-induced CD40 expression by inhibiting nuclear factor-kappa B activation in mouse osteoblasts. *Molecular immunology* 52:38-49
- Dieter P, Fitzke E (1993) Formation of diacylglycerol, inositol phosphates, arachidonic acid and its metabolites in macrophages. *European journal of biochemistry* 218:753-758
- Ding W, Yang L, Zhang M, Gu Y (2012) Reactive oxygen species-mediated endoplasmic reticulum stress contributes to aldosterone-induced apoptosis in tubular epithelial cells. *Biochemical and biophysical research communications* 418:451-456
- Domingo JL, Llobet JM, Tomas JM, Corbella J (1987) Acute toxicity of uranium in rats and mice. *Bull Environ Contam Toxicol* 39:168-174
- Dote T, Kono K, Usuda K, Nishiura H, Tagawa T (2000a) Acute renal damage dose response in rats to intravenous infusion of sodium fluoride. *Fluoride* 33:210-217
- Dote T, Kono K, Usuda K, Nishiura H, Tagawa T, Miyata K, Shimahara M, Hashiguchi N, Senda J, Tanaka Y (2000b) Toxicokinetics of intravenous fluoride in rats with renal damage caused by high-dose fluoride exposure. *International archives of occupational and environmental health* 73 Suppl:S90-92
- Dublineau I, Grandcolas L, Grison S, Baudelin C, Paquet F, Voisin P, Aigueperse J, Gourmelon P (2007) Modifications of inflammatory pathways in rat intestine following chronic ingestion of depleted uranium. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 98:458-468
- Dublineau I, Grison S, Baudelin C, Dudoignon N, Souidi M, Marquette C, Paquet F, Aigueperse J, Gourmelon P (2005) Absorption of uranium through the entire gastrointestinal tract of the rat. *International journal of radiation biology* 81:473-482
- Dublineau I, Souidi M, Gueguen Y, Lestaevél P, Bertho JM, Manens L, Delissen O, Grison S, Paulard A, Monin A, Kern Y, Rouas C, Luyen J, Gourmelon P, Aigueperse J (2014) Unexpected lack of deleterious effects of uranium on physiological systems following a chronic oral intake in adult rat. *BioMed research international* 2014:181989
- Dupree EA, Cragle DL, McLain RW, Crawford-Brown DJ, Teta MJ (1987) Mortality among workers at a uranium processing facility, the Linde Air Products Company Ceramics Plant, 1943-1949. *Scandinavian journal of work, environment & health* 13:100-107
- Edelstein CL (2017) Biomarkers in acute kidney injury. In: Edelstein CL (ed) *Biomarkers of kidney disease*, II edn, pp 241-316
- Edmunds WM, Smedley PL (2013) Fluoride in natural waters. In: Selinus O (ed) *Essentials of medical geology*, 2 edn, pp 311-336
- Eisenbud M, Quigley JA (1956) Industrial hygiene of uranium processing. *AMA archives of industrial health* 14:12-22
- Ekstrand J (1978) Relationship between fluoride in the drinking water and the plasma fluoride concentration in man. *Caries research* 12:123-127
- Ekstrand J, Ehrnebo M (1979) Influence of milk products on fluoride bioavailability in man. *European journal of clinical pharmacology* 16:211-215
- Ekstrand J, Fomon SJ, Ziegler EE, Nelson SE (1994a) Fluoride pharmacokinetics in infancy. *Pediatric research* 35:157-163
- Ekstrand J, Spak CJ, Ehrnebo M (1982) Renal clearance of fluoride in a steady state condition in man: influence of urinary flow and pH changes by diet. *Acta pharmacologica et toxicologica* 50:321-325
- Ekstrand J, Ziegler EE, Nelson SE, Fomon SJ (1994b) Absorption and retention of dietary and supplemental fluoride by infants. *Advances in dental research* 8:175-180
- Emeigh Hart SG (2005) Assessment of renal injury in vivo. *Journal of pharmacological and toxicological methods* 52:30-45
- Erharde A (1874) Kali Fluoratum zur Erhaltung der Zahne. *Memorabilien aus der Praxis* 19:359-360

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Fawell J, Bailey K, Chilton J, Dahi E, Fewtrell L, Magara Y (2006) Country data on dental and skeletal fluorosis associated with exposure to fluoride through drinking-water. Fluoride in drinking-water. World Health Organization, London, UK., pp 97-116
- Feinendegen LE, Brooks AL, Morgan WF (2011) Biological consequences and health risks of low-level exposure to ionizing radiation: commentary on the workshop. *Health physics* 100:247-259
- Ferguson MA, Vaidya VS, Bonventre JV (2008) Biomarkers of nephrotoxic acute kidney injury. *Toxicology* 245:182-193
- Feugier A, Frelon S, Gourmelon P, Claraz M (2008) Alteration of mouse oocyte quality after a subchronic exposure to depleted Uranium. *Reprod Toxicol* 26:273-277
- Fister SL, Jovic SZ (2014) The frequency of chromosomal aberrations in sheep from the area contaminated by depleted uranium during nato air strikes in 1999. *Nucl Technol Radiat* 29:88-95
- Fitsanakis VA, Erikson KM, Garcia SJ, Evje L, Syversen T, Aschner M (2006) Brain accumulation of depleted uranium in rats following 3- or 6-month treatment with implanted depleted uranium pellets. *Biological trace element research* 111:185-197
- Flora SJ, Mittal M, Mishra D (2009) Co-exposure to arsenic and fluoride on oxidative stress, glutathione linked enzymes, biogenic amines and DNA damage in mouse brain. *Journal of the neurological sciences* 285:198-205
- Frelon S, Houpert P, Lepetit D, Paquet F (2005) The chemical speciation of uranium in water does not influence its absorption from the gastrointestinal tract of rats. *Chemical research in toxicology* 18:1150-1154
- Fuchs TC, Hewitt P (2011) Biomarkers for drug-induced renal damage and nephrotoxicity-an overview for applied toxicology. *The AAPS journal* 13:615-631
- Fujigaki Y, Sun DF, Goto T, Hishida A (2003) Temporary changes in macrophages and MHC class-II molecule-expressing cells in the tubulointerstitium in response to uranyl acetate-induced acute renal failure in rats. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 443:206-216
- Fukuda S, Ikeda M, Chiba M, Kaneko K (2006) Clinical diagnostic indicators of renal and bone damage in rats intramuscularly injected with depleted uranium. *Radiation protection dosimetry* 118:307-314
- Furness PN, Harris K (1994) An evaluation of experimental models of glomerulonephritis. *International journal of experimental pathology* 75:9-22
- Garmash SA, Smirnova VS, Karp OE, Usacheva AM, Berezhnov AV, Ivanov VE, Chernikov AV, Bruskov VI, Gudkov SV (2014) Pro-oxidative, genotoxic and cytotoxic properties of uranyl ions. *Journal of environmental radioactivity* 127:163-170
- Ge Y, Ning H, Wang S, Wang J (2005) Comet assay of DNA damage in brain cells of adult rats exposed to high fluoride and low iodine. *Fluoride* 38:209-214
- Ghosh D, Das Sarkar S, Maiti R, Jana D, Das UB (2002) Testicular toxicity in sodium fluoride treated rats: association with oxidative stress. *Reprod Toxicol* 16:385-390
- Ghosh J, Das J, Manna P, Sil PC (2008) Cytoprotective effect of arjunolic acid in response to sodium fluoride mediated oxidative stress and cell death via necrotic pathway. *Toxicol In Vitro* 22:1918-1926
- Gilbert DN, Houghton DC, Bennett WM, Plamp CE, Reger K, Porter GA (1979) Reversibility of gentamicin nephrotoxicity in rats: recovery during continuous drug administration. *Proc Soc Exp Biol Med* 160:99-103
- Gilman AP, Villeneuve DC, Secours VE, Yagminas AP, Tracy BL, Quinn JM, Valli VE, Willes RJ, Moss MA (1998) Uranyl nitrate: 28-day and 91-day toxicity studies in the Sprague-Dawley rat. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 41:117-128
- Golden AP, Ellis ED, Cohen SS, Mumma MT, Leggett RW, Wallace PW, Girardi D, Watkins JP, Shore RE, Boice JD (2019) Updated mortality analysis of the Mallinckrodt uranium processing workers, 1942-2012. *Int J Radiat Biol*:1-21

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Goschorska M, Baranowska-Bosiacka I, Gutowska I, Metryka E, Skorka-Majewicz M, Chlubek D (2018a) Potential Role of Fluoride in the Etiopathogenesis of Alzheimer's Disease. *International journal of molecular sciences* 19
- Goschorska M, Baranowska-Bosiacka I, Gutowska I, Tarnowski M, Piotrowska K, Metryka E, Safranow K, Chlubek D (2018b) Effect of acetylcholinesterase inhibitors donepezil and rivastigmine on the activity and expression of cyclooxygenases in a model of the inflammatory action of fluoride on macrophages obtained from THP-1 monocytes. *Toxicology* 406-407:9-20
- Gribovskaja I, Brownlow KC, Dennis SJ, Rosko AJ, Marletta MA, Stevens-Truss R (2005) Calcium-binding sites of calmodulin and electron transfer by inducible nitric oxide synthase. *Biochemistry* 44:7593-7601
- Griffin BR, Faubel S, Edelstein CL (2019) Biomarkers of Drug-Induced Kidney Toxicity. *Therapeutic drug monitoring* 41:213-226
- Grison S, Fave G, Maillot M, Manens L, Delissen O, Blanchardon E, Dublineau I, Aigueperse J, Bohand S, Martin JC, Souidi M (2016) Metabolomics reveals dose effects of low-dose chronic exposure to uranium in rats: identification of candidate biomarkers in urine samples. *Metabolomics : Official journal of the Metabolomic Society* 12:154
- Gu LL, Zhang XY, Xing WM, Xu JD, Lu H (2016) Andrographolide-induced apoptosis in human renal tubular epithelial cells: Roles of endoplasmic reticulum stress and inflammatory response. *Environmental toxicology and pharmacology* 45:257-264
- Guan ZZ, Wang YN, Xiao KQ, Dai DY, Chen YH, Liu JL, Sindelar P, Dallner G (1998) Influence of chronic fluorosis on membrane lipids in rat brain. *Neurotoxicol Teratol* 20:537-542
- Guan ZZ, Xiao KQ, Zeng XY, Long YG, Cheng YH, Jiang SF, Wang YN (2000) Changed cellular membrane lipid composition and lipid peroxidation of kidney in rats with chronic fluorosis. *Arch Toxicol* 74:602-608
- Gueguen Y, Bontemps A, Ebrahimian TG (2019) Adaptive responses to low doses of radiation or chemicals: their cellular and molecular mechanisms. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 76:1255-1273
- Gueguen Y, Grandcolas L, Baudelin C, Grison S, Tissandie E, Jourdain JR, Paquet F, Voisin P, Aigueperse J, Gourmelon P, Souidi M (2007) Effect of acetaminophen administration to rats chronically exposed to depleted uranium. *Toxicology* 229:62-72
- Gueguen Y, Rouas C (2012) Données nouvelles sur la néphrotoxicité de l'uranium. *Radioprotection* 47:345-359
- Gueguen Y, Rouas C, Leblond FA (2012) Les biomarqueurs d'atteinte rénale. *Néphrologie et Thérapeutique* 8:146-155
- Gueguen Y, Rouas C, Monin A, Manens L, Stefani J, Delissen O, Grison S, Dublineau I (2014) Molecular, cellular, and tissue impact of depleted uranium on xenobiotic-metabolizing enzymes. *Arch Toxicol* 88:227-239
- Guéguen Y, Roy L, Hornhardt S, Badie C, Hall J, Baatout S, Pernot E, Tomasek L, Laurent O, Ebrahimian T, Ibanez C, Grison S, Kabacik S, Laurier D, Gomolka M (2017) Biomarkers for uranium risk assessment for the development of the CURE (Concerted Uranium Research in Europe) molecular epidemiological protocol. *Radiation Research* 187:107-127
- Gueguen Y, Souidi M, Baudelin C, Dudoignon N, Grison S, Dublineau I, Marquette C, Voisin P, Gourmelon P, Aigueperse J (2006) Short-term hepatic effects of depleted uranium on xenobiotic and bile acid metabolizing cytochrome P450 enzymes in the rat. *Arch Toxicol* 80:187-195
- Gueguen Y, Suhard D, Poisson C, Manens L, Elie C, Landon G, Bouvier-Capely C, Rouas C, Benderitter M, Tessier C (2015) Low-concentration uranium enters the HepG2 cell nucleus rapidly and induces cell stress response. *Toxicol In Vitro* 30:552-560
- Guerrero-Beltran CE, Mukhopadhyay P, Horvath B, Rajesh M, Tapia E, Garcia-Torres I, Pedraza-Chaverri J, Pacher P (2012) Sulforaphane, a natural constituent of broccoli, prevents cell death and inflammation in nephropathy. *The Journal of nutritional biochemistry* 23:494-500

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Gunness P, Aleksa K, Kosuge K, Ito S, Koren G (2010) Comparison of the novel HK-2 human renal proximal tubular cell line with the standard LLC-PK1 cell line in studying drug-induced nephrotoxicity. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 88:448-455
- Gupta S, Deepti A, Deegan S, Lisbona F, Hetz C, Samali A (2010) HSP72 protects cells from ER stress-induced apoptosis via enhancement of IRE1alpha-XBP1 signaling through a physical interaction. *PLoS biology* 8:e1000410
- Gutknecht J, Walter A (1981) Hydrofluoric and nitric acid transport through lipid bilayer membranes. *Biochimica et biophysica acta* 644:153-156
- Gutowska I, Baranowska-Bosiacka I, Goschorska M, Kolasa A, Lukomska A, Jakubczyk K, Dec K, Chlubek D (2015) Fluoride as a factor initiating and potentiating inflammation in THP1 differentiated monocytes/macrophages. *Toxicol In Vitro* 29:1661-1668
- Gutowska I, Baranowska-Bosiacka I, Siennicka A, Baskiewicz M, Machalinski B, Stachowska E, Chlubek D (2011) Fluoride and generation of pro-inflammatory factors in human macrophages. *Fluoride* 44:125-134
- Hakonson-Hayes AC, Fresquez PR, Whicker FW (2002) Assessing potential risks from exposure to natural uranium in well water. *Journal of environmental radioactivity* 59:29-40
- Haley DP (1982) Morphologic changes in uranyl nitrate-induced acute renal failure in saline- and water-drinking rats. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 46:196-208
- Haley DP, Bulger RE, Dobyan DC (1982) The long-term effects of uranyl nitrate on the structure and function of the rat kidney. *Virchows Archiv B, Cell pathology including molecular pathology* 41:181-192
- Hall J, Jeggo PA, West C, Gomolka M, Quintens R, Badie C, Laurent O, Aerts A, Anastasov N, Azimzadeh O, Azizova T, Baatout S, Baselet B, Benotmane MA, Blanchardon E, Gueguen Y, Haghdoost S, Harms-Ringhdahl M, Hess J, Kreuzer M, Laurier D, Macaeva E, Manning G, Pernot E, Ravanat JL, Sabatier L, Tack K, Tapio S, Zitzelsberger H, Cardis E (2017) Ionizing radiation biomarkers in epidemiological studies - An update. *Mutat Res* 771:59-84
- Hamilton MM, Ejniak JW, Carmichael AJ (1997) Uranium reactions with hydrogen peroxide studied by EPR-spin trapping with DMPO. *J Chem Soc, Perkin Trans 2*:2491-2494
- Hao P, Ma X, Cheng X, Ba Y, Zhu J, Cui L (2010) [Effect of fluoride on human hypothalamus-hypophysis-testis axis hormones]. *Wei sheng yan jiu = Journal of hygiene research* 39:53-55
- Hao Y, Huang J, Gu Y, Liu C, Li H, Liu J, Ren J, Yang Z, Peng S, Wang W, Li R (2015) Metallothionein deficiency aggravates depleted uranium-induced nephrotoxicity. *Toxicology and applied pharmacology* 287:306-315
- Hao Y, Liu C, Huang J, Gu Y, Li H, Yang Z, Liu J, Wang W, Li R (2016) Ghrelin protects against depleted uranium-induced apoptosis of MC3T3-E1 cells through oxidative stress-mediated p38-mitogen-activated protein kinase pathway. *Toxicology and applied pharmacology* 290:116-125
- Hao Y, Ren J, Liu C, Li H, Liu J, Yang Z, Li R, Su Y (2014) Zinc protects human kidney cells from depleted uranium-induced apoptosis. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 114:271-280
- Hao Y, Ren J, Liu J, Luo S, Ma T, Li R, Su Y (2012) The protective role of zinc against acute toxicity of depleted uranium in rats. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 111:402-410
- Hao Y, Ren J, Liu J, Yang Z, Liu C, Li R, Su Y (2013) Immunological changes of chronic oral exposure to depleted uranium in mice. *Toxicology* 309:81-90
- Hartsock WJ, Cohen JD, Segal DJ (2007) Uranyl acetate as a direct inhibitor of DNA-binding proteins. *Chemical research in toxicology* 20:784-789
- Hawkins CL, Davies MJ (2001) Generation and propagation of radical reactions on proteins. *Biochimica et biophysica acta* 1504:196-219
- Hayashi N, Tsutsui T (1993) Cell cycle dependence of cytotoxicity and clastogenicity induced by treatment of synchronized human diploid fibroblasts with sodium fluoride. *Mutat Res* 290:293-302

## BIBLIOGRAPHIE

---

- He H, Ganapathy V, Isales CM, Whitford GM (1998) pH-dependent fluoride transport in intestinal brush border membrane vesicles. *Biochimica et biophysica acta* 1372:244-254
- He LF, Chen JG (2006) DNA damage, apoptosis and cell cycle changes induced by fluoride in rat oral mucosal cells and hepatocytes. *World journal of gastroenterology* 12:1144-1148
- Herget-Rosenthal S, Poppen D, Husing J, Marggraf G, Pietruck F, Jakob HG, Philipp T, Kribben A (2004) Prognostic value of tubular proteinuria and enzymuria in nonoliguric acute tubular necrosis. *Clinical chemistry* 50:552-558
- Hidaka S, Kranzlin B, Gretz N, Witzgall R (2002) Urinary clusterin levels in the rat correlate with the severity of tubular damage and may help to differentiate between glomerular and tubular injuries. *Cell and tissue research* 310:289-296
- Hillier S, Cooper C, Kellingray S, Russell G, Hughes H, Coggon D (2000) Fluoride in drinking water and risk of hip fracture in the UK: a case-control study. *Lancet* 355:265-269
- Hilton R (2006) Acute renal failure. *BMJ* 333:786-790
- Hindin R, Brugge D, Panikkar B (2005) Teratogenicity of depleted uranium aerosols: a review from an epidemiological perspective. *Environmental health : a global access science source* 4:17
- Homma-Takeda S, Kitahara K, Suzuki K, Blyth BJ, Suya N, Konishi T, Terada Y, Shimada Y (2015) Cellular localization of uranium in the renal proximal tubules during acute renal uranium toxicity. *J Appl Toxicol* 35:1594-1600
- Homma-Takeda S, Terada Y, Nakata A, Sahoo SK, Yoshida S, Ueno S, Inoue M, Iso H, Ishikawa T, Konishi T, Imaseki H, Shimada Y (2009) Elemental imaging of kidneys of adult rats exposed to uranyl acetate. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 267:2167-2170
- Houpert P, Lestaevél P, Bussy C, Paquet F, Gourmelon P (2005) Enriched but not depleted uranium affects central nervous system in long-term exposed rat. *Neurotoxicology* 26:1015-1020
- Hubert P (2010) Effet des faibles doses : preuves et inférences. *Environnement, Risques et Santé* 9:295-302
- Hurault L, Creff G, Hagege A, Santucci-Darmanin S, Pagnotta S, Farlay D, Den Auwer C, Pierrefite-Carle V, Carle GF (2019) Uranium Effect on Osteocytic Cells In Vitro. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 170:199-209
- Huxley HE, Zubay G (1961) Preferential staining of nucleic acid-containing structures for electron microscopy. *J Biophys Biochem Cytol* 11:273-296
- I Inkielewicz JK (2003a) Fluoride content in soft tissues and urine of rats exposed to sodium fluoride in drinking water. *Research Report* 36:263-266
- I Inkielewicz WC, J Krechniak (2003b) Determination of fluoride in soft tissues. *Research Report* 36:16-20
- Ibanez C, Suhard D, Tessier C, Delissen O, Lestaevél P, Dublineau I, Gourmelon P (2014) Intranasal exposure to uranium results in direct transfer to the brain along olfactory nerve bundles. *Neuropathology and applied neurobiology* 40:477-488
- Ibrulj S, Haveric S, Haveric A (2007) Chromosome aberrations as bioindicators of environmental genotoxicity. *Bosnian journal of basic medical sciences* 7:311-316
- Ichimura T, Asseldonk EJ, Humphreys BD, Gunaratnam L, Duffield JS, Bonventre JV (2008) Kidney injury molecule-1 is a phosphatidylserine receptor that confers a phagocytic phenotype on epithelial cells. *The Journal of clinical investigation* 118:1657-1668
- Ichimura T, Bonventre JV, Bailly V, Wei H, Hession CA, Cate RL, Sanicola M (1998) Kidney injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury. *The Journal of biological chemistry* 273:4135-4142
- Ichimura T, Mou S (2008) Kidney injury molecule-1 in acute kidney injury and renal repair: a review. *Zhong xi yi jie he xue bao = Journal of Chinese integrative medicine* 6:533-538
- ICRP (1995a) Age-dependent doses to members of the public from intake radionuclides: Part 3, Ingestion dose coefficients. International Commission on Radiological Protection, Oxford, UK

## BIBLIOGRAPHIE

---

- ICRP (1995b) Age-dependent doses to members of the public from intake radionuclides: Part 4, Inhalation dose coefficients. International Commission on Radiological Protection, Oxford, UK
- Iheozor-Ejiofor Z, Worthington HV, Walsh T, O'Malley L, Clarkson JE, Macey R, Alam R, Tugwell P, Welch V, Glenny AM (2015) Water fluoridation for the prevention of dental caries. The Cochrane database of systematic reviews:CD010856
- IRSN (2017) Risques résultant des expositions chroniques ou répétées aux faibles doses de rayonnements ionisants - Rapport 2017-00004. Institut de Radioprotection et de Sureté Nucléaire, Fontenay aux Roses, France
- Iwakura T, Fujigaki Y, Fujikura T, Ohashi N, Kato A, Yasuda H (2016) Acquired resistance to rechallenge injury after acute kidney injury in rats is associated with cell cycle arrest in proximal tubule cells. *American journal of physiology Renal physiology* 310:F872-884
- Jayasekara KB, Dissanayake DM, Sivakanesan R, Ranasinghe A, Karunarathna RH, Priyantha Kumara GW (2015) Epidemiology of chronic kidney disease, with special emphasis on chronic kidney disease of uncertain etiology, in the north central region of Sri Lanka. *Journal of epidemiology* 25:275-280
- Jianjie C, Wenjuan X, Jinling C, Jie S, Ruhui J, Meiyang L (2016) Fluoride caused thyroid endocrine disruption in male zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat Toxicol* 171:48-58
- Jimenez-Cordova MI, Cardenas-Gonzalez M, Aguilar-Madrid G, Sanchez-Pena LC, Barrera-Hernandez A, Dominguez-Guerrero IA, Gonzalez-Horta C, Barbier OC, Del Razo LM (2018) Evaluation of kidney injury biomarkers in an adult Mexican population environmentally exposed to fluoride and low arsenic levels. *Toxicology and applied pharmacology* 352:97-106
- Jimenez-Cordova MI, Gonzalez-Horta C, Ayllon-Vergara JC, Arreola-Mendoza L, Aguilar-Madrid G, Villareal-Vega EE, Barrera-Hernandez A, Barbier OC, Del Razo LM (2019) Evaluation of vascular and kidney injury biomarkers in Mexican children exposed to inorganic fluoride. *Environ Res* 169:220-228
- Jimenez-Farfan MD, Hernandez-Guerrero JC, Juarez-Lopez LA, Jacinto-Aleman LF, de la Fuente-Hernandez J (2011) Fluoride consumption and its impact on oral health. *International journal of environmental research and public health* 8:148-160
- Jin F, Ma T, Guan H, Yang ZH, Liu XD, Wang Y, Jiang YG, Zhou PK (2017) Inhibitory effect of uranyl nitrate on DNA double-strand break repair by depression of a set of proteins in the homologous recombination pathway. *Toxicol Res (Camb)* 6:711-718
- John R, Herzenberg AM (2009) Renal toxicity of therapeutic drugs. *Journal of clinical pathology* 62:505-515
- Johnson CA, Levey AS, Coresh J, Levin A, Lau J, Eknoyan G (2004) Clinical practice guidelines for chronic kidney disease in adults: Part II. Glomerular filtration rate, proteinuria, and other markers. *American family physician* 70:1091-1097
- Joo MS, Lee CG, Koo JH, Kim SG (2013) miR-125b transcriptionally increased by Nrf2 inhibits AhR repressor, which protects kidney from cisplatin-induced injury. *Cell death & disease* 4:e899
- Joseph S, Gadhia PK (2000) Sister chromatid exchange frequency and chromosome aberrations in residents of fluoride endemic regions of south Gujarat. *Fluoride* 33:154-158
- Juntunen R (1991) Etelä-Suomen kallioporakaivojen uraani- ja radontutkimukset (Uranium and radon in wells drilled into bedrocks in southern Finland). Report of Investigation, Geological Survey of Finland, Espoo 98
- Kalinich JF, Ramakrishnan N, Villa V, McClain DE (2002) Depleted uranium-uranyl chloride induces apoptosis in mouse J774 macrophages. *Toxicology* 179:105-114
- Karaoz E, Oncu M, Gulle K, Kanter M, Gultekin F, Karaoz S, Mumcu E (2004) Effect of chronic fluorosis on lipid peroxidation and histology of kidney tissues in first- and second-generation rats. *Biological trace element research* 102:199-208
- Karie S, Launay-Vacher V, Deray G, Isnard-Bagnis C (2010) [Drugs renal toxicity]. *Nephrologie & thérapeutique* 6:58-74



## BIBLIOGRAPHIE

---

- Karpas Z, Lorber A, Elish E, Kol R, Roiz Y, Marko R, Katorza E, Halicz L, Riondato J, Vanhaecke F, Moens L (1998) Uptake of ingested uranium after low "acute intake". *Health physics* 74:337-345
- Kathren RL, Burklin RK (2008) Acute chemical toxicity of uranium. *Health physics* 94:170-179
- Kaufman RJ (2002) Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *The Journal of clinical investigation* 110:1389-1398
- Kaushal GP, Shah SV (2016) Autophagy in acute kidney injury. *Kidney international* 89:779-791
- Keane AT, Polednak AP (1983) Retention of uranium in the chest: implications of findings in vivo and postmortem. *Health physics* 44 Suppl 1:391-402
- Khan NM, Sandur SK, Checker R, Sharma D, Poduval TB, Sainis KB (2011) Pro-oxidants ameliorate radiation-induced apoptosis through activation of the calcium-ERK1/2-Nrf2 pathway. *Free radical biology & medicine* 51:115-128
- Khandare AL, Gourineni SR, Validandi V (2017) Dental fluorosis, nutritional status, kidney damage, and thyroid function along with bone metabolic indicators in school-going children living in fluoride-affected hilly areas of Doda district, Jammu and Kashmir, India. *Environmental monitoring and assessment* 189:579
- Kim FM, Hayes C, Williams PL, Whitford GM, Joshipura KJ, Hoover RN, Douglass CW (2011) An assessment of bone fluoride and osteosarcoma. *Journal of dental research* 90:1171-1176
- Kitahara K, Numako C, Terada Y, Nitta K, Shimada Y, Homma-Takeda S (2017) Uranium XAFS analysis of kidney from rats exposed to uranium. *Journal of synchrotron radiation* 24:456-462
- Kitamura M (2008) Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in renal pathophysiology: Janus faces. *American journal of physiology Renal physiology* 295:F323-334
- Kobayashi CA, Leite AL, Silva TL, Santos LD, Nogueira FC, Oliveira RC, Palma MS, Domont GB, Buzalaf MA (2009) Proteomic analysis of kidney in rats chronically exposed to fluoride. *Chem Biol Interact* 180:305-311
- Komatsu M, Kurokawa H, Waguri S, Taguchi K, Kobayashi A, Ichimura Y, Sou YS, Ueno I, Sakamoto A, Tong KI, Kim M, Nishito Y, Iemura S, Natsume T, Ueno T, Kominami E, Motohashi H, Tanaka K, Yamamoto M (2010) The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nature cell biology* 12:213-223
- Konietzka R (2015) Gastrointestinal absorption of uranium compounds--a review. *Regulatory toxicology and pharmacology* : RTP 71:125-133
- Kour K, Singh J (1980) Histological findings in kidneys of mice following sodium fluoride administration. *Fluoride* 13:163-167
- Kroemer G, Marino G, Levine B (2010) Autophagy and the integrated stress response. *Molecular cell* 40:280-293
- Kundt MS, Martinez-Taibo C, Muhlmann MC, Furnari JC (2009) Uranium in drinking water: effects on mouse oocyte quality. *Health physics* 96:568-574
- Kurttio P, Auvinen A, Salonen L, Saha H, Pekkanen J, Makelainen I, Vaisanen SB, Penttila IM, Komulainen H (2002) Renal effects of uranium in drinking water. *Environ Health Perspect* 110:337-342
- Kurttio P, Harmoinen A, Saha H, Salonen L, Karpas Z, Komulainen H, Auvinen A (2006) Kidney toxicity of ingested uranium from drinking water. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 47:972-982
- Kurttio P, Komulainen H, Leino A, Salonen L, Auvinen A, Saha H (2005) Bone as a possible target of chemical toxicity of natural uranium in drinking water. *Environ Health Perspect* 113:68-72
- La Rovere RM, Roest G, Bultynck G, Parys JB (2016) Intracellular Ca(2+) signaling and Ca(2+) microdomains in the control of cell survival, apoptosis and autophagy. *Cell calcium* 60:74-87
- La Touche YD, Willis DL, Dawydiak OI (1987) Absorption and biokinetics of U in rats following an oral administration of uranyl nitrate solution. *Health physics* 53:147-162
- LaCerte C, Xie H, Aboueissa AM, Wise JP, Sr. (2010) Particulate depleted uranium is cytotoxic and clastogenic to human lung epithelial cells. *Mutat Res* 697:33-37

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Lagarde F, Beausoleil C, Belcher SM, Belzunces LP, Emond C, Guerbet M, Rousselle C (2015) Non-monotonic dose-response relationships and endocrine disruptors: a qualitative method of assessment. *Environmental health : a global access science source* 14:13
- Lang S, Kosma VM, Kumlin T, Halinen A, Salonen RO, Servomaa K, Rytomaa T, Ruuskanen J (1994) Distribution and short-term effects of intratracheally instilled neutron-irradiated UO<sub>2</sub> particles in the rat. *Environ Res* 65:119-131
- Lantz O, Jouvin MH, De Vernejoul MC, Druet P (1987) Fluoride-induced chronic renal failure. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 10:136-139
- Le Gallic C, Phalente Y, Manens L, Dublineau I, Benderitter M, Gueguen Y, Lehoux S, Ebrahimian TG (2015) Chronic Internal Exposure to Low Dose <sup>137</sup>Cs Induces Positive Impact on the Stability of Atherosclerotic Plaques by Reducing Inflammation in ApoE<sup>-/-</sup> Mice. *PloS one* 10:e0128539
- Leach LJ, Maynard EA, Hodge HC, Scott JK, Yuile CL, Sylvester GE, Wilson HB (1970) A five-year inhalation study with natural uranium dioxide (UO<sub>2</sub>) dust. I. Retention and biologic effect in the monkey, dog and rat. *Health physics* 18:599-612
- Lee JH, Jung JY, Jeong YJ, Park JH, Yang KH, Choi NK, Kim SH, Kim WJ (2008) Involvement of both mitochondrial- and death receptor-dependent apoptotic pathways regulated by Bcl-2 family in sodium fluoride-induced apoptosis of the human gingival fibroblasts. *Toxicology* 243:340-347
- Leggett RW (1989) The behavior and chemical toxicity of U in the kidney: a reassessment. *Health physics* 57:365-383
- Leggett RW (1994) Basis for the ICRP's age-specific biokinetic model for uranium. *Health physics* 67:589-610
- Leggett RW, Harrison JD (1995) Fractional absorption of ingested uranium in humans. *Health physics* 68:484-498
- Leggett RW, Pellmar TC (2003) The biokinetics of uranium migrating from embedded DU fragments. *Journal of environmental radioactivity* 64:205-225
- Lemercier V, Millot X, Ansoborlo E, Menetrier F, Flury-Herard A, Rousselle C, Scherrmann JM (2003) Study of uranium transfer across the blood-brain barrier. *Radiation protection dosimetry* 105:243-245
- Lestaevel P, Bussy C, Paquet F, Dhieux B, Clarencon D, Houpert P, Gourmelon P (2005) Changes in sleep-wake cycle after chronic exposure to uranium in rats. *Neurotoxicol Teratol* 27:835-840
- Lestaevel P, Dhieux B, Delissen O, Benderitter M, Aigueperse J (2015) Uranium modifies or not behavior and antioxidant status in the hippocampus of rats exposed since birth. *The Journal of toxicological sciences* 40:99-107
- Lestaevel P, Romero E, Dhieux B, Ben Soussan H, Berradi H, Dublineau I, Voisin P, Gourmelon P (2009) Different pattern of brain pro-/anti-oxidant activity between depleted and enriched uranium in chronically exposed rats. *Toxicology* 258:1-9
- Li J, Shi Y, Fan H, Li Y, Zhu Y, Lin X, Zhang J (2018) Effects of Fluoride on Surface Structure of Primary Culture Leydig Cells in Mouse. *Biological trace element research* 183:123-127
- Li JJ, Lee SH, Kim DK, Jin R, Jung DS, Kwak SJ, Kim SH, Han SH, Lee JE, Moon SJ, Ryu DR, Yoo TH, Han DS, Kang SW (2009) Colchicine attenuates inflammatory cell infiltration and extracellular matrix accumulation in diabetic nephropathy. *American journal of physiology Renal physiology* 297:F200-209
- Liang C, Gao Y, Zhao Y, Manthari RK, Ma J, Niu R, Wang J, Zhang J (2018) Effects of Fluoride and/or Sulfur Dioxide on Morphology and DNA Integrity in Rats' Hepatic Tissue. *Biological trace element research* 183:335-341
- Lin RH, Wu LJ, Lee CH, Lin-Shiau SY (1993) Cytogenetic toxicity of uranyl nitrate in Chinese hamster ovary cells. *Mutat Res* 319:197-203
- Linares V, Albina ML, Belles M, Mayayo E, Sanchez DJ, Domingo JL (2005) Combined action of uranium and stress in the rat. II. Effects on male reproduction. *Toxicology letters* 158:186-195

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Linares V, Sanchez DJ, Belles M, Albina L, Gomez M, Domingo JL (2007) Pro-oxidant effects in the brain of rats concurrently exposed to uranium and stress. *Toxicology* 236:82-91
- Lindemann G, Pindborg JJ, Poulsen H (1959) Recovery of the rat kidney in fluorosis. *AMA archives of pathology* 67:30-33
- Liu J, Qu W, Kadiiska MB (2009) Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. *Toxicology and applied pharmacology* 238:209-214
- Liu JL, Xia T, Yu YY, Sun XZ, Zhu Q, He W, Zhang M, Wang A (2005) [The dose-effect relationship of water fluoride levels and renal damage in children]. *Wei sheng yan jiu = Journal of hygiene research* 34:287-288
- Liu L, Zhang Y, Gu H, Zhang K, Ma L (2015) Fluorosis induces endoplasmic reticulum stress and apoptosis in osteoblasts in vivo. *Biological trace element research* 164:64-71
- Liu WJ, Luo MN, Tan J, Chen W, Huang LZ, Yang C, Pan Q, Li B, Liu HF (2014) Autophagy activation reduces renal tubular injury induced by urinary proteins. *Autophagy* 10:243-256
- Liu X, Nie ZW, Gao YY, Chen L, Yin SY, Zhang X, Hao C, Miao YL (2018) Sodium fluoride disturbs DNA methylation of NNAT and declines oocyte quality by impairing glucose transport in porcine oocytes. *Environmental and molecular mutagenesis* 59:223-233
- Liu YJ, Guan ZZ, Gao Q, Pei JJ (2011) Increased level of apoptosis in rat brains and SH-SY5Y cells exposed to excessive fluoride--a mechanism connected with activating JNK phosphorylation. *Toxicology letters* 204:183-189
- Locker D, Lawrence H, Jokovic A (1999) Benefits and risks of water fluoridation: an update of the 1996 federal-provincial sub-committee report. Faculty of Dentistry. Community Dental Health Services Research Unit, University of Toronto
- Lodermann B, Wunderlich R, Frey S, Schorn C, Stangl S, Rodel F, Keilholz L, Fietkau R, Gaipf US, Frey B (2012) Low dose ionising radiation leads to a NF-kappaB dependent decreased secretion of active IL-1beta by activated macrophages with a discontinuous dose-dependency. *International journal of radiation biology* 88:727-734
- Luessenhop AJ, Gallimore JC, Sweet WH, Struxness EG, Robinson J (1958) The toxicity in man of hexavalent uranium following intravenous administration. *The American journal of roentgenology, radium therapy, and nuclear medicine* 79:83-100
- Lukinuk C, DasGupta R, Mahoney JL (1997) Hydrofluoric acid burns: a case report. *Can J Plast Surg* 5
- Lund K, Ekstrand J, Boe J, Sostrand P, Kongerud J (1997) Exposure to hydrogen fluoride: an experimental study in humans of concentrations of fluoride in plasma, symptoms, and lung function. *Occupational and environmental medicine* 54:32-37
- Lundin FE, Jr. (1969) Lloyd JW, Smith EM, Archer VE, Holaday DA: Mortality of uranium miners in relation to radiation exposure, hard-rock mining and cigarette smoking--1950 through September 1967. *Health physics* 16:571-578
- Luo Q, Cui H, Deng H, Kuang P, Liu H, Lu Y, Fang J, Zuo Z, Deng J, Li Y, Wang X, Zhao L (2017) Sodium fluoride induces renal inflammatory responses by activating NF-kappaB signaling pathway and reducing anti-inflammatory cytokine expression in mice. *Oncotarget* 8:80192-80207
- Luo Q, Guo H, Kuang P, Cui H, Deng H, Liu H, Lu Y, Wei Q, Chen L, Fang J, Zuo Z, Deng J, Li Y, Wang X, Zhao L (2018) Sodium Fluoride Arrests Renal G2/M Phase Cell-Cycle Progression by Activating ATM-Chk2-P53/Cdc25C Signaling Pathway in Mice. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 51:2421-2433
- Maclaughlin EJ, Sleeper RB, McNatty D, Raehl CL (2006) Management of age-related osteoporosis and prevention of associated fractures. *Therapeutics and clinical risk management* 2:281-295
- Manivannan J, Sinha S, Ghosh M, Mukherjee A (2013) Evaluation of multi-endpoint assay to detect genotoxicity and oxidative stress in mice exposed to sodium fluoride. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 751:59-65

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Manocha SL, Warner H, Olkowski ZL (1975) Cytochemical response of kidney, liver and nervous system of fluoride ions in drinking water. *The Histochemical journal* 7:343-355
- Markich SJ, Jeffree RA, Burke PT (2002) Freshwater bivalve shells as archival indicators of metal pollution from a copper-uranium mine in tropical northern Australia. *Environmental science & technology* 36:821-832
- Mascarenhas AK (2000) Risk factors for dental fluorosis: a review of the recent literature. *Pediatric dentistry* 22:269-277
- Mathew ST, Bergstrom P, Hammarsten O (2014) Repeated Nrf2 stimulation using sulforaphane protects fibroblasts from ionizing radiation. *Toxicology and applied pharmacology* 276:188-194
- Matsumoto H, Hamada N, Takahashi A, Kobayashi Y, Ohnishi T (2007) Vanguard of paradigm shift in radiation biology: radiation-induced adaptive and bystander responses. *Journal of radiation research* 48:97-106
- McCann HG, Bullock FA (1957) The effect of fluoride ingestion on the composition and solubility of mineralized tissues of the rat. *Journal of dental research* 36:391-398
- McDiarmid MA, Cloeren M, Gaitens JM, Hines S, Streeten E, Breyer RJ, 3rd, Brown CH, Condon M, Roth T, Oliver M, Brown L, Dux M, Lewin-Smith MR, Strathmann F, Velez-Quinones MA, Gucer P (2018) Surveillance results and bone effects in the Gulf War depleted uranium-exposed cohort. *Journal of toxicology and environmental health Part A* 81:1083-1097
- McDiarmid MA, Engelhardt S, Oliver M, Gucer P, Wilson PD, Kane R, Kabat M, Kaup B, Anderson L, Hoover D, Brown L, Handwerker B, Albertini RJ, Jacobson-Kram D, Thorne CD, Squibb KS (2004) Health effects of depleted uranium on exposed Gulf War veterans: a 10-year follow-up. *Journal of toxicology and environmental health Part A* 67:277-296
- McDiarmid MA, Engelhardt SM, Oliver M, Gucer P, Wilson PD, Kane R, Cernich A, Kaup B, Anderson L, Hoover D, Brown L, Albertini R, Gudi R, Jacobson-Kram D, Squibb KS (2007) Health surveillance of Gulf War I veterans exposed to depleted uranium: updating the cohort. *Health physics* 93:60-73
- McDiarmid MA, Engelhardt SM, Oliver M, Gucer P, Wilson PD, Kane R, Kabat M, Kaup B, Anderson L, Hoover D, Brown L, Albertini RJ, Gudi R, Jacobson-Kram D, Thorne CD, Squibb KS (2006) Biological monitoring and surveillance results of Gulf War I veterans exposed to depleted uranium. *International archives of occupational and environmental health* 79:11-21
- McDiarmid MA, Keogh JP, Hooper FJ, McPhaul K, Squibb K, Kane R, DiPino R, Kabat M, Kaup B, Anderson L, Hoover D, Brown L, Hamilton M, Jacobson-Kram D, Burrows B, Walsh M (2000) Health effects of depleted uranium on exposed Gulf War veterans. *Environ Res* 82:168-180
- McDonagh MS, Whiting PF, Wilson PM, Sutton AJ, Chestnutt I, Cooper J, Misso K, Bradley M, Treasure E, Kleijnen J (2000) Systematic review of water fluoridation. *BMJ* 321:855-859
- McIvor ME (1987) Delayed fatal hyperkalemia in a patient with acute fluoride intoxication. *Annals of emergency medicine* 16:1165-1167
- McIvor ME (1990) Acute fluoride toxicity. *Pathophysiology and management. Drug safety* 5:79-85
- McKee D, Thoma A, Bailey K, Fish J (2014) A review of hydrofluoric acid burn management. *Plast Surg (Oakv)* 22:95-98
- Mehta RL, Kellum JA, Shah SV, Molitoris BA, Ronco C, Warnock DG, Levin A (2007) Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Crit Care* 11:R31
- Mellberg JR, Ripa LW (1983) Fluoride metabolism. *Fluoride in preventive dentistry Theory and clinical applications. Quintessence Pub. Co., University of Michigan, USA, pp 81-102*
- Mendrala AL, Markham DA, Eisenbrandt DL (2005) Rapid uptake, metabolism, and elimination of inhaled sulfuric fluoride fumigant by rats. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 86:239-247
- Michael M, Barot VV, Chinoy NJ (1996) Investigations of soft tissue functions in fluorotic individuals of north Gujarat. *Fluoride* 29:63-71

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Milacic S, Simic J (2009) Identification of health risks in workers staying and working on the terrains contaminated with depleted uranium. *Journal of radiation research* 50:213-222
- Miller AC (2006) Depleted uranium: properties, uses, and health consequences. Boca Raton CRC Press:288
- Miller AC (2007) Observation of radiation-specific damage in cells exposed to depleted uranium: hprt gene mutation frequency. *Radiation Measurements*:1029-1032
- Miller AC, Brooks K, Smith J, Page N (2004) Effect of the militarily-relevant heavy metals, depleted uranium and heavy metal tungsten-alloy on gene expression in human liver carcinoma cells (HepG2). *Molecular and cellular biochemistry* 255:247-256
- Miller AC, Brooks K, Stewart M, Anderson B, Shi L, McClain D, Page N (2003) Genomic instability in human osteoblast cells after exposure to depleted uranium: delayed lethality and micronuclei formation. *Journal of environmental radioactivity* 64:247-259
- Miller AC, Stewart M, Brooks K, Shi L, Page N (2002a) Depleted uranium-catalyzed oxidative DNA damage: absence of significant alpha particle decay. *Journal of inorganic biochemistry* 91:246-252
- Miller AC, Xu J, Stewart M, Brooks K, Hodge S, Shi L, Page N, McClain D (2002b) Observation of radiation-specific damage in human cells exposed to depleted uranium: dicentric frequency and neoplastic transformation as endpoints. *Radiation protection dosimetry* 99:275-278
- Mishra J, Mori K, Ma Q, Kelly C, Barasch J, Devarajan P (2004) Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a novel early urinary biomarker for cisplatin nephrotoxicity. *American journal of nephrology* 24:307-315
- Mitchel RE (2015) Adaption By Low Dose Radiation Exposure: A Look at Scope and Limitations for Radioprotection. Dose-response : a publication of International Hormesis Society 13
- Mittal M, Flora SJ (2006) Effects of individual and combined exposure to sodium arsenite and sodium fluoride on tissue oxidative stress, arsenic and fluoride levels in male mice. *Chem Biol Interact* 162:128-139
- Mody N, Parhami F, Sarafian TA, Demer LL (2001) Oxidative stress modulates osteoblastic differentiation of vascular and bone cells. *Free radical biology & medicine* 31:509-519
- Momot J (1964) Le rôle du fluor dans le chimisme volcanique. *Bulletin mensuel de la société linnéenne de Lyon*, 33ème année, pp 330-334
- Monleau M, De Meo M, Frelon S, Paquet F, Donnadiou-Claraz M, Dumenil G, Chazel V (2006a) Distribution and genotoxic effects after successive exposure to different uranium oxide particles inhaled by rats. *Inhalation toxicology* 18:885-894
- Monleau M, De Meo M, Paquet F, Chazel V, Dumenil G, Donnadiou-Claraz M (2006b) Genotoxic and inflammatory effects of depleted uranium particles inhaled by rats. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 89:287-295
- Moon YJL, A. K.; Chung, H. C.; Kim, E. J.; Kim, S. H.; Lee, D. C.; Lee, I.; Kim, S. G.; Lee, M. G. (2003) Effects of acute renal failure on the pharmacokinetics of chlorzoxazone in rats. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 31:776-784
- Moss MA (1983) Uranium in drinking water - report on clinical studies in Nova Scotia Chemical toxicology and clinical chemistry of metals. Dalhousie Univ., Halifax, Nova Scotia (Canada), Montreal, Canada
- Moss MA (1985) Chronic low level uranium exposure via drinking water - clinical investigations in Nova Scotia. Dalhousie University, Halifax, Nova Scotia
- Mukhopadhyay D, Chattopadhyay A (2014) Induction of oxidative stress and related transcriptional effects of sodium fluoride in female zebrafish liver. *Bull Environ Contam Toxicol* 93:64-70
- Mukhopadhyay D, Priya P, Chattopadhyay A (2015a) Sodium fluoride affects zebrafish behaviour and alters mRNA expressions of biomarker genes in the brain: Role of Nrf2/Keap1. *Environmental toxicology and pharmacology* 40:352-359

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Mukhopadhyay D, Srivastava R, Chattopadhyay A (2015b) Sodium fluoride generates ROS and alters transcription of genes for xenobiotic metabolizing enzymes in adult zebrafish (*Danio rerio*) liver: expression pattern of Nrf2/Keap1 (INrf2). *Toxicology mechanisms and methods* 25:364-373
- Murley JS, Kataoka Y, Weydert CJ, Oberley LW, Grdina DJ (2006) Delayed radioprotection by nuclear transcription factor kappaB -mediated induction of manganese superoxide dismutase in human microvascular endothelial cells after exposure to the free radical scavenger WR1065. *Free radical biology & medicine* 40:1004-1016
- Nair AR, Lee WK, Smeets K, Swennen Q, Sanchez A, Thevenod F, Cuypers A (2015) Glutathione and mitochondria determine acute defense responses and adaptive processes in cadmium-induced oxidative stress and toxicity of the kidney. *Arch Toxicol* 89:2273-2289
- Nasman P, Ekstrand J, Granath F, Ekblom A, Fored CM (2013) Estimated drinking water fluoride exposure and risk of hip fracture: a cohort study. *Journal of dental research* 92:1029-1034
- Navathej A, Sujatha K, Srilatha CH (2015) Effect of aloe vera whole leaf extract on fluoride induced pathomorphological changes in soft tissues in growing rats. *J Veterinar Sci Technol* 6:S13-003
- Neuman WF, Neuman MW, Main ER, O'Leary J, Smith FA (1950) The surface chemistry of bone. II. Fluoride deposition. *The Journal of biological chemistry* 187:655-661
- Newbrun E (1986) *Fluorides and dental caries: contemporary concepts for practitioners and students*, 3 edn. Thomas, University of Michigan, USA.
- Ng CY, Cheng SH, Yu KN (2016) Hormetic effect induced by depleted uranium in zebrafish embryos. *Aquat Toxicol* 175:184-191
- NHMRC (2007) *A systematic review of the efficacy and safety of fluoridation. Part A: Review methodology and results*. National Health and Medical Research Council, Canberra, Australia
- Nielsen PE, Hiort C, Sönnichsen SH, Buchardt O, Dahl O, Norden B (1992) DNA binding and photocleavage by uranyl(VI) salts. *Journal of the American Chemical Society* 114:4967-4975
- Niu R, Chen H, Manthari RK, Sun Z, Wang J, Zhang J (2018) Effects of fluoride on synapse morphology and myelin damage in mouse hippocampus. *Chemosphere* 194:628-633
- Niu R, Xue X, Zhao Y, Sun Z, Yan X, Li X, Feng C, Wang J (2015) Effects of fluoride on microtubule ultrastructure and expression of Tubalpha1a and Tubbeta2a in mouse hippocampus. *Chemosphere* 139:422-427
- Novikov Iu V (1972) [Uranium accumulation in the kidneys and bone tissue with chronic enteral administration]. *Gigiena i sanitarii* 37:109-110
- Nriagu J, Nam DH, Ayanwola TA, Dinh H, Erdenechimeg E, Ochir C, Bolormaa TA (2012) High levels of uranium in groundwater of Ulaanbaatar, Mongolia. *The Science of the total environment* 414:722-726
- O'Mullane DM, Baez RJ, Jones S, Lennon MA, Petersen PE, Rugg-Gunn AJ, Whelton H, Whitford GM (2016) Fluoride and Oral Health. *Community dental health* 33:69-99
- Odin I, Nathan N (2005) Anesthésiques halogénés. *Annales francaises d'anesthesie et de reanimation*:36-285-A-210
- Olivieri G, Bodycote J, Wolff S (1984) Adaptive response of human lymphocytes to low concentrations of radioactive thymidine. *Science* 223:594-597
- Ortega A, Domingo JL, Llobet JM, Tomas JM, Paternain JL (1989) Evaluation of the oral toxicity of uranium in a 4-week drinking-water study in rats. *Bull Environ Contam Toxicol* 42:935-941
- Pabla N, Dong Z (2008) Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and renoprotective strategies. *Kidney international* 73:994-1007
- Pallet N, Bastard JP, Claeysens S, Fellahi S, Delanaye P, Pieroni L, Causse E (2019) Proteinuria typing: how, why and for whom? *Annales de biologie clinique* 77:13-25
- Paquet F, Adam-Guillermin C, Ansoborlo E, Beaugelin-Seiller K, Carriere M, Dublineau I, Taran F, Vidaud C (2009) Chapitre 23 - Uranium. In: Ménager MT, Garnier-Laplace J, Goyffon M (eds) *Toxicologie nucléaire environnementale et humaine*. Edition Tex&Doc - Lavoisier, pp 411-443

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Paquet F, Frelon S, Cote G, Madic C (2003) The contribution of chemical speciation to internal dosimetry. *Radiation protection dosimetry* 105:179-184
- Paquet F, Houpert P, Blanchardon E, Delissen O, Maubert C, Dhieux B, Moreels AM, Frelon S, Gourmelon P (2006) Accumulation and distribution of uranium in rats after chronic exposure by ingestion. *Health physics* 90:139-147
- Parikh CR, Devarajan P (2008) New biomarkers of acute kidney injury. *Critical care medicine* 36:S159-165
- Park HS, Seong KM, Kim JY, Kim CS, Yang KH, Jin YW, Nam SY (2013) Chronic low-dose radiation inhibits the cells death by cytotoxic high-dose radiation increasing the level of AKT and acinus proteins via NF-kappaB activation. *International journal of radiation biology* 89:371-377
- Partanen S (2002) Inhibition of human renal acid phosphatases by nephrotoxic micromolar concentrations of fluoride. *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie* 54:231-237
- Pasanen M, Lang S, Kojo A, Kosma VM (1995) Effects of simulated nuclear fuel particles on the histopathology and CYP enzymes in the rat lung and liver. *Environ Res* 70:126-133
- Paulin R (1997) Radionucléides naturels. In: *toxiques nucléaires*, Deuxième edn. Galle, P. Masson.
- Pellmar TC, Fuciarelli AF, Ejnik JW, Hamilton M, Hogan J, Strocko S, Emond C, Mottaz HM, Landauer MR (1999) Distribution of uranium in rats implanted with depleted uranium pellets. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 49:29-39
- Pereira S, Camilleri V, Floriani M, Cavalie I, Garnier-Laplace J, Adam-Guillermin C (2012) Genotoxicity of uranium contamination in embryonic zebrafish cells. *Aquat Toxicol* 109:11-16
- Periyakaruppan A, Kumar F, Sarkar S, Sharma CS, Ramesh GT (2007) Uranium induces oxidative stress in lung epithelial cells. *Arch Toxicol* 81:389-395
- Periyakaruppan A, Sarkar S, Ravichandran P, Sadanandan B, Sharma CS, Ramesh V, Hall JC, Thomas R, Wilson BL, Ramesh GT (2009) Uranium induces apoptosis in lung epithelial cells. *Arch Toxicol* 83:595-600
- Petitot F, Frelon S, Moreels AM, Claraz M, Delissen O, Tournalias E, Dhieux B, Maubert C, Paquet F (2007a) Incorporation and distribution of uranium in rats after a contamination on intact or wounded skin. *Health physics* 92:464-474
- Petitot F, Gautier C, Moreels AM, Frelon S, Paquet F (2007b) Percutaneous penetration of uranium in rats after a contamination on intact or wounded skin. *Radiation protection dosimetry* 127:125-130
- Petitot F, Moreels AM, Paquet F (2004) In vitro evaluation of percutaneous diffusion of uranyl nitrate through intact or excoriated skin of rat and pig. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 82:133-139
- Phipps KR, Orwoll ES, Mason JD, Cauley JA (2000) Community water fluoridation, bone mineral density, and fractures: prospective study of effects in older women. *BMJ* 321:860-864
- Pierrefite-Carle V, Santucci-Darmanin S, Breuil V, Gritsaenko T, Vidaud C, Creff G, Solari PL, Pagnotta S, Al-Sahlane R, Auwer CD, Carle GF (2016) Effect of natural uranium on the UMR-106 osteoblastic cell line: impairment of the autophagic process as an underlying mechanism of uranium toxicity. *Arch Toxicol*
- Pindborg JJ (1957) The effect of 0.05 percent dietary sodium fluoride on the rat kidney. *Acta pharmacologica et toxicologica* 13:36-45
- Podder S, Chattoapadhyay A, Bhattacharya S, Ray MR (2008) Differential in vivo genotoxic effects of lower and higher concentrations of fluoride in mouse bone marrow cells. *Fluoride* 41:301-307
- Podder S, Chattopadhyay A, Bhattacharya S (2011a) Reduction in fluoride-induced genotoxicity in mouse bone marrow cells after substituting high fluoride-containing water with safe drinking water. *J Appl Toxicol* 31:703-705

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Podder S, Chattopadhyay A, Bhattacharya S, Ray MR, Chakraborty A (2011b) Fluoride-induced genotoxicity in mouse bone marrow cells: effect of buthionine sulfoximine and N-acetyl-L-cysteine. *J Appl Toxicol* 31:618-625
- Poisson C (2013) Rôle du stress oxydant au niveau hépatique et rénal dans la toxicité de l'uranium après exposition chronique. Université Paris-Sud 11, Chatenay-Malabry, France
- Poisson C, Stefani J, Manens L, Delissen O, Suhard D, Tessier C, Dublineau I, Gueguen Y (2014) Chronic uranium exposure dose-dependently induces glutathione in rats without any nephrotoxicity. *Free Radic Res* 48:1218-1231
- Polednak AP, Frome EL (1981) Mortality among men employed between 1943 and 1947 at a uranium-processing plant. *Journal of occupational medicine : official publication of the Industrial Medical Association* 23:169-178
- Pourahmad J, Ghashang M, Etehad HA, Ghalandari R (2006) A search for cellular and molecular mechanisms involved in depleted uranium (DU) toxicity. *Environmental toxicology* 21:349-354
- Prasad AV, Mohan N, Chandrasekar B, Meltz ML (1994) Activation of nuclear factor kappa B in human lymphoblastoid cells by low-dose ionizing radiation. *Radiat Res* 138:367-372
- Prat O, Berenguer F, Malard V, Tavan E, Sage N, Steinmetz G, Quemeneur E (2005) Transcriptomic and proteomic responses of human renal HEK293 cells to uranium toxicity. *Proteomics* 5:297-306
- Prat O, Berenguer F, Steinmetz G, Ruat S, Sage N, Quemeneur E (2010) Alterations in gene expression in cultured human cells after acute exposure to uranium salt: Involvement of a mineralization regulator. *Toxicol In Vitro* 24:160-168
- Priest ND, Howells GR, Green D, Haines JW (1982) Uranium in bone: metabolic and autoradiographic studies in the rat. *Human toxicology* 1:97-114
- Prozialeck WC, Edwards JR, Vaidya VS, Bonventre JV (2009) Preclinical evaluation of novel urinary biomarkers of cadmium nephrotoxicity. *Toxicology and applied pharmacology* 238:301-305
- Prozialeck WC, Vaidya VS, Liu J, Waalkes MP, Edwards JR, Lamar PC, Bernard AM, Dumont X, Bonventre JV (2007) Kidney injury molecule-1 is an early biomarker of cadmium nephrotoxicity. *Kidney international* 72:985-993
- Qian W, Miao K, Li T, Zhang Z (2013) Effect of selenium on fluoride-induced changes in synaptic plasticity in rat hippocampus. *Biological trace element research* 155:253-260
- Quadri JA, Sarwar S, Pinky, Kar P, Singh S, Mallick SR, Arava S, Nag TC, Roy TS, Shariff A (2018a) Fluoride induced tissue hypercalcemia, IL-17 mediated inflammation and apoptosis lead to cardiomyopathy: Ultrastructural and biochemical findings. *Toxicology* 406-407:44-57
- Quadri JA, Sarwar S, Sinha A, Kalaivani M, Dinda AK, Bagga A, Roy TS, Das TK, Shariff A (2018b) Fluoride-associated ultrastructural changes and apoptosis in human renal tubule: a pilot study. *Human & experimental toxicology* 37:1199-1206
- Radons J (2016) The human HSP70 family of chaperones: where do we stand? *Cell stress & chaperones* 21:379-404
- Rage E, Caer-Lorho S, Drubay D, Ancelet S, Laroche P, Laurier D (2015) Mortality analyses in the updated French cohort of uranium miners (1946-2007). *Int Arch Occup Environ Health* 88:717-730
- Ranjan R, Swarup D, Patra RC (2009) Oxidative stress indices in erythrocytes, liver, and kidneys of fluoride-exposed rabbits. *Fluoride* 4:83-93
- Refsnes M, Becher R, Lag M, Skuland T, Schwarze PE (1999) Fluoride-induced interleukin-6 and interleukin-8 synthesis in human epithelial lung cells. *Human & experimental toxicology* 18:645-652
- Refsnes M, Schwarze PE, Holme JA, Lag M (2003) Fluoride-induced apoptosis in human epithelial lung cells (A549 cells): role of different G protein-linked signal systems. *Human & experimental toxicology* 22:111-123



## BIBLIOGRAPHIE

---

- Refsnes M, Skuland T, Schwarze PE, Ovrevik J, Lag M (2008) Fluoride-induced IL-8 release in human epithelial lung cells: relationship to EGF-receptor-, SRC- and MAP-kinase activation. *Toxicology and applied pharmacology* 227:56-67
- Refsnes M, Thrane EV, Lag M, Thoresen GH, Schwarze PE (2001) Mechanisms in fluoride-induced interleukin-8 synthesis in human lung epithelial cells. *Toxicology* 167:145-158
- Reisser-Rubrecht L, Torne-Celer C, Renier W, Averseng O, Plantevin S, Quemeneur E, Bellanger L, Vidaud C (2008) High-affinity uranyl-specific antibodies suitable for cellular imaging. *Chemical research in toxicology* 21:349-357
- Reynolds KE, Whitford GM, Pashley DH (1978) Acute fluoride toxicity: the influence of acid-base status. *Toxicology and applied pharmacology* 45:415-427
- Ribeiro DA, Alves de Lima PL, Marques ME, Salvadori DM (2006) Lack of DNA damage induced by fluoride on mouse lymphoma and human fibroblast cells by single cell gel (comet) assay. *Brazilian dental journal* 17:91-94
- Ribeiro DA, Marques ME, de Assis GF, Anzai A, Poleti ML, Salvadori DM (2004) No relationship between subchronic fluoride intake and DNA damage in Wistar rats. *Caries research* 38:576-579
- Ripa LW (1993) A half-century of community water fluoridation in the United States: review and commentary. *Journal of public health dentistry* 53:17-44
- Roch-Lefevre S, Pouzoulet F, Giraudet AL, Voisin P, Vaurijoux A, Gruel G, Gregoire E, Buard V, Delbos M, Bourhis J, Roy L (2010) Cytogenetic assessment of heterogeneous radiation doses in cancer patients treated with fractionated radiotherapy. *The British journal of radiology* 83:759-766
- Rodel F, Hantschel M, Hildebrandt G, Schultze-Mosgau S, Rodel C, Herrmann M, Sauer R, Voll RE (2004) Dose-dependent biphasic induction and transcriptional activity of nuclear factor kappa B (NF-kappaB) in EA.hy.926 endothelial cells after low-dose X-irradiation. *International journal of radiation biology* 80:115-123
- Rodrigues G, Arruda-Neto JD, Pereira RM, Kleeb SR, Geraldo LP, Primi MC, Takayama L, Rodrigues TE, Cavalcante GT, Genofre GC, Semmler R, Nogueira GP, Fontes EM (2013) Uranium deposition in bones of Wistar rats associated with skeleton development. *Applied radiation and isotopes : including data, instrumentation and methods for use in agriculture, industry and medicine* 82:105-110
- Rouas C, Bensoussan H, Suhard D, Tessier C, Grandcolas L, Rebiere F, Dublineau I, Taouis M, Pallardy M, Lestaevel P, Gueguen Y (2010) Distribution of soluble uranium in the nuclear cell compartment at subtoxic concentrations. *Chemical research in toxicology* 23:1883-1889
- Rouas C, Souidi M, Grandcolas L, Grison S, Baudelin C, Gourmelon P, Pallardy M, Gueguen Y (2009) Acetaminophen induces xenobiotic-metabolizing enzymes in rat: Impact of a uranium chronic exposure. *Environmental toxicology and pharmacology* 28:363-369
- Rouas C, Stefani J, Grison S, Grandcolas L, Baudelin C, Dublineau I, Pallardy M, Gueguen Y (2011) Effect of nephrotoxic treatment with gentamicin on rats chronically exposed to uranium. *Toxicology* 279:27-35
- RSNZ, PMCSA (2014) Health effects of water fluoridation: a review of the scientific evidence. Prime Minister's Chief Science Advisor  
Royal Society of New Zealand
- Russo LM, Sandoval RM, McKee M, Osicka TM, Collins AB, Brown D, Molitoris BA, Comper WD (2007) The normal kidney filters nephrotic levels of albumin retrieved by proximal tubule cells: retrieval is disrupted in nephrotic states. *Kidney international* 71:504-513
- Ryan MJ, Johnson G, Kirk J, Fuerstenberg SM, Zager RA, Torok-Storb B (1994) HK-2: an immortalized proximal tubule epithelial cell line from normal adult human kidney. *Kidney international* 45:48-57
- Salonen L (1994) 238U series radionuclides as a source of increased radioactivity in groundwater originating from Finnish bedrock. *Future Groundwater Resources at Risk (Proceedings of the Helsinki Conference, June 1994)* 222

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Sangeetha Vijayan P, Rekha PD, Arun AB (2019) Role of PI3K-Akt and MAPK signaling in uranyl nitrate-induced nephrotoxicity. *Biological trace element research* 189:405-411
- Sangeetha Vijayan P, Rekha PD, Dinesh U, Arun AB (2016) Biochemical and histopathological responses of the Swiss albino mice treated with uranyl nitrate and its recovery. *Renal failure* 38:770-775
- Santoyo-Sanchez MP, del Carmen Silva-Lucero M, Arreola-Mendoza L, Barbier OC (2013) Effects of acute sodium fluoride exposure on kidney function, water homeostasis, and renal handling of calcium and inorganic phosphate. *Biological trace element research* 152:367-372
- Sanz-Gallen P, Nogue S, Munne P, Faraldo A (2001) Hypocalcaemia and hypomagnesaemia due to hydrofluoric acid. *Occup Med (Lond)* 51:294-295
- Sarinana-Ruiz YA, Vazquez-Arenas J, Sosa-Rodriguez FS, Labastida I, Armienta MA, Aragon-Pina A, Escobedo-Bretado MA, Gonzalez-Valdez LS, Ponce-Pena P, Ramirez-Aldaba H, Lara RH (2017) Assessment of arsenic and fluorine in surface soil to determine environmental and health risk factors in the Comarca Lagunera, Mexico. *Chemosphere* 178:391-401
- Sarkar C, Pal S (2014) Ameliorative effect of resveratrol against fluoride-induced alteration of thyroid function in male wistar rats. *Biological trace element research* 162:278-287
- Sasaki D, Yamada A, Umeno H, Kurihara H, Nakatsuji S, Fujihira S, Tsubota K, Ono M, Moriguchi A, Watanabe K, Seki J (2011) Comparison of the course of biomarker changes and kidney injury in a rat model of drug-induced acute kidney injury. *Biomarkers : biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals* 16:553-566
- Sasaki MS, Ejima Y, Tachibana A, Yamada T, Ishizaki K, Shimizu T, Nomura T (2002) DNA damage response pathway in radioadaptive response. *Mutat Res* 504:101-118
- Scarlatti F, Granata R, Meijer AJ, Codogno P (2009) Does autophagy have a license to kill mammalian cells? *Cell death and differentiation* 16:12-20
- Scherberich JE (1990) Urinary proteins of tubular origin: basic immunochemical and clinical aspects. *American journal of nephrology* 10 Suppl 1:43-51
- Schiffel H (2008) Fluoridation of drinking water and chronic kidney disease: absence of evidence is not evidence of absence. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 23:411
- Schroder M (2006) The unfolded protein response. *Molecular biotechnology* 34:279-290
- Schulze-Specking A, Duyster J, Gebicke-Haerter PJ, Wurster S, Dieter P (1991) Effect of fluoride, pertussis and cholera toxin on the release of arachidonic acid and the formation of prostaglandin E<sub>2</sub>, D<sub>2</sub>, superoxide and inositol phosphates in rat liver macrophages. *Cellular signalling* 3:599-606
- Selden AI, Lundholm C, Edlund B, Hogdahl C, Ek BM, Bergstrom BE, Ohlson CG (2009) Nephrotoxicity of uranium in drinking water from private drilled wells. *Environ Res* 109:486-494
- Shanthakumari D, Srinivasalu S, Subramanian S (2004) Effect of fluoride intoxication on lipidperoxidation and antioxidant status in experimental rats. *Toxicology* 204:219-228
- Shao M, Lu X, Cong W, Xing X, Tan Y, Li Y, Li X, Jin L, Wang X, Dong J, Jin S, Zhang C, Cai L (2014) Multiple low-dose radiation prevents type 2 diabetes-induced renal damage through attenuation of dyslipidemia and insulin resistance and subsequent renal inflammation and oxidative stress. *PLoS one* 9:e92574
- Sharma R, Tsuchiya M, Bartlett JD (2008) Fluoride induces endoplasmic reticulum stress and inhibits protein synthesis and secretion. *Environ Health Perspect* 116:1142-1146
- Sharma R, Tsuchiya M, Skobe Z, Tannous BA, Bartlett JD (2010) The acid test of fluoride: how pH modulates toxicity. *PLoS one* 5:e10895
- Shashi A, Singh J, Thapar S (2002) Toxic effects of fluoride on rabbit kidney. *Fluoride* 35:38-50
- Sheth FJ, Multani AS, Chinoy NJ (1994) Sister chromatid exchanges: a study in fluorotic individuals of North Gujarat. *Fluoride* 27:215-219
- Shewmake SW, Anderson BG (1979) Hydrofluoric acid burns. A report of a case and review of the literature. *Archives of dermatology* 115:593-596

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Shivarajashankara YM, Shivashankara AR, Bhat PG, Rao SH (2003) Lipid peroxidation and antioxidant systems in the blood of young rats subjected to chronic fluoride toxicity. *Indian J Exp Biol* 41:857-860
- Shuhua X, Ziyou L, Ling Y, Fei W, Sun G (2012) A role of fluoride on free radical generation and oxidative stress in BV-2 microglia cells. *Mediators of inflammation* 2012:102954
- Shulman ER, Vallejo M (1990) Effect of gastric contents on the bioavailability of fluoride in humans. *Pediatric dentistry* 12:237-240
- Simons TJ (1993) Lead-calcium interactions in cellular lead toxicity. *Neurotoxicology* 14:77-85
- Singh R, Khatri P, Srivastava N, Jain S, Brahmachari V, Mukhopadhyay A, Mazumder S (2017) Fluoride exposure abates pro-inflammatory response and induces in vivo apoptosis rendering zebrafish (*Danio rerio*) susceptible to bacterial infections. *Fish & shellfish immunology* 63:314-321
- Smirnova VS, Gudkov SV, Shtarkman IN, Chernikov AV, Bruskov VI (2005) [The genotoxic action of uranyl ions on DNA in vitro caused by the generation of reactive oxygen species]. *Biofizika* 50:456-463
- Sohn SJ, Kim SY, Kim HS, Chun YJ, Han SY, Kim SH, Moon A (2013) In vitro evaluation of biomarkers for cisplatin-induced nephrotoxicity using HK-2 human kidney epithelial cells. *Toxicology letters* 217:235-242
- Souidi M, Gueguen Y, Linard C, Dudoignon N, Grison S, Baudelin C, Marquette C, Gourmelon P, Aigueperse J, Dublineau I (2005) In vivo effects of chronic contamination with depleted uranium on CYP3A and associated nuclear receptors PXR and CAR in the rat. *Toxicology* 214:113-122
- Stearns DM, Yazzie M, Bradley AS, Coryell VH, Shelley JT, Ashby A, Asplund CS, Lantz RC (2005) Uranyl acetate induces hprt mutations and uranium-DNA adducts in Chinese hamster ovary EM9 cells. *Mutagenesis* 20:417-423
- Stoneman J, Wallar L, Papadopoulos A (2014) La fluoration de l'eau de consommation au Canada - tendances, avantages et risques. Centre de collaboration nationale en santé environnementale, Vancouver, Canada
- Suhard D, Tessier C, Manens L, Rebiere F, Tack K, Agarande M, Gueguen Y (2018) Intracellular uranium distribution: Comparison of cryogenic fixation versus chemical fixation methods for SIMS analysis. *Microscopy research and technique* 81:855-864
- Suketa Y, Mikami E (1977) Changes in urinary ion excretion and related renal enzyme activities in fluoride-treated rats. *Toxicology and applied pharmacology* 40:551-559
- Sun F, Li X, Yang C, Lv P, Li G, Xu H (2014) A role for PERK in the mechanism underlying fluoride-induced bone turnover. *Toxicology* 325:52-66
- Sun Y, Fujigaki Y, Sakakima M, Hishida A (2010) Acquired resistance to rechallenge injury in rats recovered from subclinical renal damage with uranyl acetate--Importance of proliferative activity of tubular cells. *Toxicology and applied pharmacology* 243:104-110
- Sun Z, Niu R, Wang B, Jiao Z, Wang J, Zhang J, Wang S (2011) Fluoride-induced apoptosis and gene expression profiling in mice sperm in vivo. *Arch Toxicol* 85:1441-1452
- Sun Z, Wang B, Niu R, Zhang J, Wang J (2009) Decreased sperm hyperactivation and low Catsper1 expression in mice exposed to fluoride. *Fluoride* 42:167-173
- Sun Z, Zhang W, Xue X, Zhang Y, Niu R, Li X, Li B, Wang X, Wang J (2016) Fluoride decreased the sperm ATP of mice through inhibiting mitochondrial respiration. *Chemosphere* 144:1012-1017
- Susa M, Standke GJ, Jeschke M, Rohner D (1997) Fluoroaluminate induces pertussis toxin-sensitive protein phosphorylation: differences in MC3T3-E1 osteoblastic and NIH3T3 fibroblastic cells. *Biochemical and biophysical research communications* 235:680-684
- Suzuki M, Bandoski C, Bartlett JD (2015) Fluoride induces oxidative damage and SIRT1/autophagy through ROS-mediated JNK signaling. *Free radical biology & medicine* 89:369-378
- Suzuki M, Bartlett JD (2014) Sirtuin1 and autophagy protect cells from fluoride-induced cell stress. *Biochimica et biophysica acta* 1842:245-255

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Suzuki M, Ikeda A, Bartlett JD (2018) Sirt1 overexpression suppresses fluoride-induced p53 acetylation to alleviate fluoride toxicity in ameloblasts responsible for enamel formation. *Arch Toxicol* 92:1283-1293
- Suzuki M, Sierant ML, Antone JV, Everett ET, Whitford GM, Bartlett JD (2014) Uncoupling protein-2 is an antioxidant that is up-regulated in the enamel organ of fluoride-treated rats. *Connective tissue research* 55 Suppl 1:25-28
- Szumiel I (2012) Radiation hormesis: Autophagy and other cellular mechanisms. *International journal of radiation biology* 88:619-628
- Taguchi K, Fujikawa N, Komatsu M, Ishii T, Unno M, Akaike T, Motohashi H, Yamamoto M (2012) Keap1 degradation by autophagy for the maintenance of redox homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109:13561-13566
- Tang S, Zhang S, Chen W, Quan C, Duan P, Huang W, Wang A, Yang K (2017) [Effects of fluoride on autophagy level in human neuroblastoma SH-SY5Y cells]. *Wei sheng yan jiu = Journal of hygiene research* 46:472-480
- Tasat DR, Orona NS, Mandalunis PM, Cabrini RL, Ubios AM (2007) Ultrastructural and metabolic changes in osteoblasts exposed to uranyl nitrate. *Arch Toxicol* 81:319-326
- Taulan M, Paquet F, Argiles A, Demaille J, Romey MC (2006) Comprehensive analysis of the renal transcriptional response to acute uranyl nitrate exposure. *BMC Genomics* 7:2
- Taylor JM, Scott JK, Maynard EA, Smith FA, Hodge HC (1961) Toxic effects of fluoride on the rat kidney. I. Acute injury from single large doses. *Toxicology and applied pharmacology* 3:278-289
- Tebbutt THY (1983) Relationship between natural water quality and health. Unesco, Paris, France
- Tepperman PB (1980) Fatality due to acute systemic fluoride poisoning following a hydrofluoric acid skin burn. *Journal of occupational medicine : official publication of the Industrial Medical Association* 22:691-692
- Tessier C, Suhard D, Rebiere F, Souidi M, Dublineau I, Agarande M (2012) Uranium microdistribution in renal cortex of rats after chronic exposure: a study by secondary ion mass spectrometry microscopy. *Microscopy and microanalysis : the official journal of Microscopy Society of America, Microbeam Analysis Society, Microscopical Society of Canada* 18:123-133
- Thiebault C, Carriere M, Milgram S, Simon A, Avoscan L, Gouget B (2007) Uranium induces apoptosis and is genotoxic to normal rat kidney (NRK-52E) proximal cells. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 98:479-487
- Thompson JD, Nechay BR (1981) Inhibition by metals of a canine renal calcium, magnesium-activated adenosinetriphosphatase. *Journal of toxicology and environmental health* 7:901-908
- Thrane EV, Refsnes M, Thoresen GH, Lag M, Schwarze PE (2001) Fluoride-induced apoptosis in epithelial lung cells involves activation of MAP kinases p38 and possibly JNK. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 61:83-91
- Tirmarche M (2018) Cancer risk following alpha-emitter exposure. *Annals of the ICRP* 47:115-125
- Tissandie E, Gueguen Y, Lobaccaro JM, Grandcolas L, Voisin P, Aigueperse J, Gourmelon P, Souidi M (2007) In vivo effects of chronic contamination with depleted uranium on vitamin D3 metabolism in rat. *Biochimica et biophysica acta* 1770:266-272
- Tournier BB, Frelon S, Tournalias E, Agez L, Delissen O, Dublineau I, Paquet F, Petitot F (2009) Role of the olfactory receptor neurons in the direct transport of inhaled uranium to the rat brain. *Toxicology letters* 190:66-73
- Trautner K, Einwag J (1987) Factors influencing the bioavailability of fluoride from calcium-rich, health-food products and CaF<sub>2</sub> in man. *Archives of oral biology* 32:401-406
- Tripathi N, Bajpai S, Tripathi M (2009) Genotoxic alterations induced by fluoride in Asian catfish, *Clarias batrachus* (Linn). *Fluoride* 42:292-296
- Trof RJ, Di Maggio F, Leemreis J, Groeneveld AB (2006) Biomarkers of acute renal injury and renal failure. *Shock* 26:245-253

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Tsutsui T, Suzuki N, Ohmori M (1984) Sodium fluoride-induced morphological and neoplastic transformation, chromosome aberrations, sister chromatid exchanges, and unscheduled DNA synthesis in cultured syrian hamster embryo cells. *Cancer Res* 44:938-941
- Tubiana M, Feinendegen LE, Yang C, Kaminski JM (2009) The linear no-threshold relationship is inconsistent with radiation biologic and experimental data. *Radiology* 251:13-22
- Tymen H, Gerasimo P, Hoffschir D (2000) Contamination and decontamination of rat and human skin with plutonium and uranium, studied with a Franz's chamber. *International journal of radiation biology* 76:1417-1424
- Ubios AM, Guglielmotti MB, Steimetz T, Cabrini RL (1991) Uranium inhibits bone formation in physiologic alveolar bone modeling and remodeling. *Environ Res* 54:17-23
- Ubios AM, Marzorati M, Cabrini RL (1997) Skin alterations induced by long-term exposure to uranium and their effect on permeability. *Health physics* 72:713-715
- UNSCEAR (2008) Sources and effects of ionizing radiation. Volume I: Sources. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation, New York, New York, USA
- UNSCEAR (2012) Biological mechanisms of radiation actions at low doses - a white paper to guide the Scientific Committee's future programme of work United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation, New York, New York, USA
- UNSCEAR (2016) Sources, effects and risks of ionizing radiation. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation, U.S.
- Usuda K, Kono K, Dote T, Nishiura K, Miyata K, Nishiura H, Shimahara M, Sugimoto K (1998) Urinary biomarkers monitoring for experimental fluoride nephrotoxicity. *Arch Toxicol* 72:104-109
- Vaidya VS, Ford GM, Waikar SS, Wang Y, Clement MB, Ramirez V, Glaab WE, Troth SP, Sistare FD, Prozialeck WC, Edwards JR, Bobadilla NA, Mefferd SC, Bonventre JV (2009) A rapid urine test for early detection of kidney injury. *Kidney international* 76:108-114
- VanDyke RA (1979) Fluoride from anesthetics and its consequences. In Johansen et al. (Eds) Continuing evaluation of the use of fluorides AAAS Selected Symposium 11. Westview Press, Boulder, Colorado, US
- Verstrepen WA, Persy VP, Verhulst A, Dauwe S, De Broe ME (2001) Renal osteopontin protein and mRNA upregulation during acute nephrotoxicity in the rat. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 16:712-724
- Vicente-Vicente L, Quiros Y, Perez-Barriocanal F, Lopez-Novoa JM, Lopez-Hernandez FJ, Morales AI (2010) Nephrotoxicity of uranium: pathophysiological, diagnostic and therapeutic perspectives. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 118:324-347
- Vich Z, Kriklava J (1970) Erythrocytes of uranium miners: the red blood picture. *British journal of industrial medicine* 27:83-85
- Villa A, Anabalón M, Zohouri V, Maguire A, Franco AM, Rugg-Gunn A (2010) Relationships between fluoride intake, urinary fluoride excretion and fluoride retention in children and adults: an analysis of available data. *Caries research* 44:60-68
- Wade-Gueye NM, Delissen O, Gourmelon P, Aigueperse J, Dublineau I, Souidi M (2012) Chronic exposure to natural uranium via drinking water affects bone in growing rats. *Biochimica et biophysica acta* 1820:1121-1127
- Wan B, Fleming JT, Schultz TW, Sayler GS (2006) In vitro immune toxicity of depleted uranium: effects on murine macrophages, CD4+ T cells, and gene expression profiles. *Environ Health Perspect* 114:85-91
- Wang AG, Chu QL, He WH, Xia T, Liu JL, Zhang M, Nussler AK, Chen XM, Yang KD (2005) Effects on protein and mRNA expression levels of p53 induced by fluoride in human embryonic hepatocytes. *Toxicology letters* 158:158-163

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Wang AG, Xia T, Chu QL, Zhang M, Liu F, Chen XM, Yang KD (2004) Effects of fluoride on lipid peroxidation, DNA damage and apoptosis in human embryo hepatocytes. *Biomedical and environmental sciences* : BES 17:217-222
- Wang J, Zhang Y, Zhang H, Zhang K, Zhang Z, Li J (2009) Toxic effects of fluoride on reproductive ability in male rats: sperm motility, oxidative stress, cell cycle, and testicular apoptosis. *Fluoride* 42:174-178
- Ware LB, Johnson AC, Zager RA (2011) Renal cortical albumin gene induction and urinary albumin excretion in response to acute kidney injury. *American journal of physiology Renal physiology* 300:F628-638
- Waring WS, Moonie A (2011) Earlier recognition of nephrotoxicity using novel biomarkers of acute kidney injury. *Clin Toxicol (Phila)* 49:720-728
- Wasana HM, Aluthpatabendi D, Kularatne WM, Wijekoon P, Weerasooriya R, Bandara J (2016) Drinking water quality and chronic kidney disease of unknown etiology (CKDu): synergic effects of fluoride, cadmium and hardness of water. *Environmental geochemistry and health* 38:157-168
- Waziri M, Musa U, Hati SS (2012) Assessment of fluoride concentrations in surface waters and groundwater sources in northeastern Nigeria. *Resour Environ* 2:67-72
- Wei Q, Luo Q, Liu H, Chen L, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, Li Y, Wang X, Zhao L (2018) The mitochondrial pathway is involved in sodium fluoride (NaF)-induced renal apoptosis in mice. *Toxicol Res (Camb)* 7:792-808
- Weinstein LH, Davison AW (2004) Fluorides in the environment. Effects on plants and animals. CABI, Oxon, UK
- Werner M, Costa MJ, Mitchell LG, Nayar R (1995) Nephrotoxicity of xenobiotics. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 237:107-154
- Westhuyzen J, Endre ZH, Reece G, Reith DM, Saltissi D, Morgan TJ (2003) Measurement of tubular enzymuria facilitates early detection of acute renal impairment in the intensive care unit. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 18:543-551
- Whitford GM (1990) The physiological and toxicological characteristics of fluoride. *Journal of dental research* 69 Spec No:539-549; discussion 556-537
- Whitford GM (1996) The metabolism and toxicity of fluoride, 2 edn. Karger, University of Michigan
- Whitford GM (2011a) Acute toxicity of ingested fluoride. In: Lussi A, Huysmans MCDNJM, H.-P. W (eds) *Monograph in oral science Fluoride and the oral environment*. Karger, pp 66-80
- Whitford GM (2011b) Acute toxicity of ingested fluoride. *Monographs in oral science* 22:66-80
- Whitford GM, Bawden JW, H. BW, J. BL, E. CJ, Clarkson TW, B. IP, M. K, M. MT, McGuire S, H. OR, Robinson C, Schultz JS, K. SG, S. TM, Venkateswarlu DT (1994) Zero, Report for Working Group I: strategies for improving the assessment of fluoride accumulation in body fluids and tissues. *Adv Dent Res* 8:113-115
- Whitford GM, Pashley DH, Reynolds KE (1979) Fluoride tissue distribution: short-term kinetics. *The American journal of physiology* 236:F141-148
- Whitford GM, Pashley DH, Stringer GI (1976) Fluoride renal clearance: a pH-dependent event. *The American journal of physiology* 230:527-532
- WHO (2001) Depleted uranium: sources, exposure and health effects. World Health Organization, Geneva, Switzerland
- WHO (2002) Fluorides. World Health Organization, Geneva, Switzerland
- WHO (2006) Fluoride in drinking water. World Health Organization, Geneva, Switzerland
- WHO (2011) Guidelines for drinking-water Quality. Fourth edn. World Health Organization, Geneva, Switzerland
- WHO (2012) Uranium in drinking water. World Health Organization, Geneva, Switzerland
- Wilk-Blaszczak MA, French AS, Man SF (1992) Halide permeation through 10 pS and 20 pS anion channels in human airway epithelial cells. *Biochimica et biophysica acta* 1104:160-166

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Wilson J, Young A, Civitello ER, Stearns DM (2014) Analysis of heat-labile sites generated by reactions of depleted uranium and ascorbate in plasmid DNA. *Journal of biological inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry* 19:45-57
- Wise SS, Thompson WD, Aboueissa AM, Mason MD, Wise JP, Sr. (2007) Particulate depleted uranium is cytotoxic and clastogenic to human lung cells. *Chemical research in toxicology* 20:815-820
- Wrenn ME, Durbin PW, Howard B, Lipsztein J, Rundo J, Still ET, Willis DL (1985) Metabolism of ingested U and Ra. *Health physics* 48:601-633
- Wu DQ, Wu Y (1995) Micronucleus and sister chromatid exchange frequency in endemic fluorosis. *Fluoride* 28:125-127
- Wu Q, Cheng X, Hofstadler SA, Smith RD (1996) Specific metal-oligonucleotide binding studied by high resolution tandem mass spectrometry. *Journal of mass spectrometry : JMS* 31:669-675
- Wu S, Yan W, Qiu B, Liao Y, Gu J, Wei S, Zhang A, Pan X (2019) Aberrant methylation-induced dysfunction of p16 is associated with osteoblast activation caused by fluoride. *Environmental toxicology* 34:37-47
- Xing X, Zhang C, Shao M, Tong Q, Zhang G, Li C, Cheng J, Jin S, Ma J, Wang G, Li X, Cai L (2012) Low-dose radiation activates Akt and Nrf2 in the kidney of diabetic mice: a potential mechanism to prevent diabetic nephropathy. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2012:291087
- Xiong X, Liu J, He W, Xia T, He P, Chen X, Yang K, Wang A (2007) Dose-effect relationship between drinking water fluoride levels and damage to liver and kidney functions in children. *Environ Res* 103:112-116
- Xu B, Xu Z, Xia T, He P, Gao P, He W, Zhang M, Guo L, Niu Q, Wang A (2011) Effects of the Fas/Fas-L pathway on fluoride-induced apoptosis in SH-SY5Y cells. *Environmental toxicology* 26:86-92
- Xu H, Jin XQ, Jing L, Li GS (2006) Effect of sodium fluoride on the expression of bcl-2 family and osteopontin in rat renal tubular cells. *Biological trace element research* 109:55-60
- Yan N, Liu Y, Liu S, Cao S, Wang F, Wang Z, Xi S (2016) Fluoride-Induced Neuron Apoptosis and Expressions of Inflammatory Factors by Activating Microglia in Rat Brain. *Molecular neurobiology* 53:4449-4460
- Yan X, Dong N, Hao X, Xing Y, Tian X, Feng J, Xie J, Lv Y, Wei C, Gao Y, Qiu Y, Wang T (2019) Comparative Transcriptomics Reveals the Role of the Toll-Like Receptor Signaling Pathway in Fluoride-Induced Cardiotoxicity. *Journal of agricultural and food chemistry* 67:5033-5042
- Yazzie M, Gamble SL, Civitello ER, Stearns DM (2003) Uranyl acetate causes DNA single strand breaks in vitro in the presence of ascorbate (vitamin C). *Chemical research in toxicology* 16:524-530
- Yellowhair M, Romanotto MR, Stearns DM, Clark Lantz R (2018) Uranyl acetate induced DNA single strand breaks and AP sites in Chinese hamster ovary cells. *Toxicology and applied pharmacology* 349:29-38
- Yiin JH, Anderson JL, Bertke SJ, Tollerud DJ (2018) Dose-response relationships between internally-deposited uranium and select health outcomes in gaseous diffusion plant workers, 1948-2011. *American journal of industrial medicine* 61:605-614
- Yu SY, Chung HC, Kim EJ, Kim SH, Lee I, Kim SG, Lee MG (2002) Effects of acute renal failure induced by uranyl nitrate on the pharmacokinetics of intravenous theophylline in rats: the role of CYP2E1 induction in 1,3-dimethyluric acid formation. *The Journal of pharmacy and pharmacology* 54:1687-1692
- Yuan Y, Zheng J, Zhao T, Tang X, Hu N (2017) Hydrogen sulfide alleviates uranium-induced acute hepatotoxicity in rats: Role of antioxidant and antiapoptotic signaling. *Environmental toxicology* 32:581-593
- Zabulyte D, Uleckiene S, Kalibatas J, Paltanaviciene A, Jascaniniene N, Stosik M (2007) Experimental studies on effect of sodium fluoride and nitrate on biochemical parameters in rats. *Bull Vet Inst Pulawy* 51:79-82
- Zager RA, Iwata M (1997) Inorganic fluoride. Divergent effects on human proximal tubular cell viability. *The American journal of pathology* 150:735-745

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Zamora ML, Tracy BL, Zielinski JM, Meyerhof DP, Moss MA (1998) Chronic ingestion of uranium in drinking water: a study of kidney bioeffects in humans. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 43:68-77
- Zamora ML, Zielinski JM, Moodie GB, Falcomer RA, Hunt WC, Capello K (2009) Uranium in drinking water: renal effects of long-term ingestion by an aboriginal community. *Archives of environmental & occupational health* 64:228-241
- Zhang A, Li H, Xiao Y, Chen L, Zhu X, Li J, Ma L, Pan X, Chen W, He Z (2017a) Aberrant methylation of nucleotide excision repair genes is associated with chronic arsenic poisoning. *Biomarkers : biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals* 22:429-438
- Zhang J, Zhu WJ, Xu XH, Zhang ZG (2011) Effect of fluoride on calcium ion concentration and expression of nuclear transcription factor kappa-B rho65 in rat hippocampus. *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie* 63:407-411
- Zhang J, Zhu Y, Liang C, Qie M, Niu R, Sun Z, Wang J (2017b) Effects of Fluoride on Expression of P450, CREM and ACT Proteins in Rat Testes. *Biological trace element research* 175:156-160
- Zhang M, Wang A, He W, He P, Xu B, Xia T, Chen X, Yang K (2007) Effects of fluoride on the expression of NCAM, oxidative stress, and apoptosis in primary cultured hippocampal neurons. *Toxicology* 236:208-216
- Zhang M, Wang A, Xia T, He P (2008) Effects of fluoride on DNA damage, S-phase cell-cycle arrest and the expression of NF-kappaB in primary cultured rat hippocampal neurons. *Toxicology letters* 179:1-5
- Zhang Y, Sun X, Sun G, Liu S, Wang L (2006) DNA damage induced by fluoride in rat osteoblasts. *Fluoride* 39:191-194
- Zhang Y, Xie L, Li X, Chai L, Chen M, Kong X, Wang Q, Liu J, Zhi L, Yang C, Wang H (2018) Effects of fluoride on morphology, growth, development, and thyroid hormone of Chinese toad (*Bufo gargarizans*) embryos. *Environmental and molecular mutagenesis* 59:123-133
- Zhao H, Chai L, Wang H (2013) Effects of fluoride on metamorphosis, thyroid and skeletal development in *Bufo gargarizans* tadpoles. *Ecotoxicology* 22:1123-1132
- Zhao Y, Li Y, Wang J, Manthari RK (2018) Fluoride induces apoptosis and autophagy through the IL-17 signaling pathway in mice hepatocytes. *Arch Toxicol* 92:3277-3289
- Zheng J, Zhao T, Yuan Y, Hu N, Tang X (2015) Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) attenuates uranium-induced acute nephrotoxicity through oxidative stress and inflammatory response via Nrf2-NF-kappaB pathways. *Chem Biol Interact* 242:353-362
- Zhu G, Xiang X, Chen X, Wang L, Hu H, Weng S (2009) Renal dysfunction induced by long-term exposure to depleted uranium in rats. *Arch Toxicol* 83:37-46
- Zimmerman KL, Barber DS, Ehrich MF, Tobias L, Hancock S, Hinckley J, Binder EM, Jortner BS (2007) Temporal clinical chemistry and microscopic renal effects following acute uranyl acetate exposure. *Toxicologic pathology* 35:1000-1009







**Titre :** Étude de la réponse adaptative rénale et des mécanismes sous-jacents après exposition chronique à de faibles concentrations d'uranium ou de fluor

**Mots-clés :** uranium, fluor, réponse adaptative, faible dose, rein

**Résumé :** L'uranium (U) et le fluor (F) sont des substances néphrotoxiques naturelles et anthropogéniques auxquelles la population peut être exposée quotidiennement. Cependant, leurs effets à faibles doses restent méconnus et des études précédentes suggèrent qu'une exposition chronique à de faibles doses pourrait induire une réponse adaptative (RA). Afin de mettre en évidence cette RA rénale *in vivo*, un protocole d'exposition prime à faibles doses suivie d'un traitement challenge néphrotoxique a été mis en place. Une première étude dose-réponse aiguë a permis de définir nos conditions challenge, avec des doses néphrotoxiques de 5 et 7.5 mg/kg d'U et de F, et un temps d'analyse de 72h post-injection. Pour l'étude de la RA, les souris ont été contaminées 6 mois *via* l'eau de boisson à des doses prime d'U (0, 10, 20 et 40 mg/L) ou de F (0, 15, 30 et 50 mg/L), puis traitées aux concentrations « challenge ». Une RA est observée aux doses respectives de 20 et 50 mg/L d'U et de F, avec un retour à la normale de l'expression et de la sécrétion de biomarqueurs de néphrotoxicité KIM-1 et CLU en comparaison aux animaux non pré-exposés. Une diminution de l'apoptose ou de l'expression *in situ* de VCAM est observée chez les animaux pré-exposés respectivement à 20 mg/L d'U ou à 50 mg/L de fluor, concentrations auxquelles la RA a été identifiée. L'autophagie, la réponse UPR et le recrutement de cellules inflammatoires sont des mécanismes induits par l'U alors que seule la réponse UPR est induite par le F. Cependant, nos résultats ne permettent pas de les identifier comme des mécanismes impliqués dans la RA, car ces derniers sont induits avec ou sans préexposition. En conclusion, cette étude montre l'existence d'une RA dans le cadre d'une exposition chronique à de faibles doses d'U ou de F chez la souris, avec l'induction de mécanismes adaptatifs tels que la régulation de l'apoptose et de l'inflammation. Ces résultats permettent de mieux appréhender les effets de faibles expositions chroniques chez l'Homme, et d'apporter de nouvelles connaissances pour la radioprotection de l'Homme.

**Title:** Study of the adaptive response in the kidney and the underlying mechanisms after chronic exposure to low doses of uranium and fluoride

**Keywords:** uranium, fluoride, adaptive response, low dose, kidney

**Abstract:** Human population can be daily exposed to uranium (U) and fluoride (F) because of their natural and anthropogenic presence in the environment. Although U and F are known to be nephrotoxicant at high doses, their effects after low dose exposures are still unknown and previous studies suggested that chronic exposures to low doses of U or F could induce adaptive responses (AR). Therefore, a mouse *in vivo* study was designed and carried out to examine whether exposure to chronic low priming doses of U and F can induce AR in the kidney upon exposure to nephrotoxic challenge treatment. A pilot dose-response study allowed selecting the nephrotoxic challenge treatments (5 mg/kg U and 7.5 mg/kg F), with a time of analysis of 72h post treatment. To study the AR, mice were exposed through drinking water for 6 months to priming doses of U (10, 20 and 40 mg/L) or F (15, 30 and 50 mg/L), and subsequently challenged. An AR was observed at the doses of 20 mg/L U and 50 mg/L F, with a return to normal gene expression and urinary levels of nephrotoxicity biomarkers KIM-1 and CLU in comparison with the non-pre-exposed mice. Apoptosis was reduced in animals pre-exposed to 20 mg/L U and a decrease of VCAM *in situ* expression was observed in animals pre-exposed to 50 mg/L F. These concentrations correspond to the appearance of AR. The unfolded protein response (UPR), autophagy and inflammatory cell recruitment were the mechanisms induced by U whereas only UPR was induced by F. However, these mechanisms were induced in challenged animals irrespective of pre-exposure. Thus, our results do not allow us to identify these mechanisms as those involved in the AR. In summary, our data showed the existence of an AR to low doses of U and F delivered chronically to mice, with the induction of adaptive mechanisms such as apoptosis and inflammatory regulation. Results of this study allow for better understanding of the potential effects chronic low-dose exposures of U and F on human population, and provide new knowledge for informing the radioprotection system.

